PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

To:

Commissioner
US Department of Commerce
United States Patent and Trademark Office, PCT
2011 South Clark Place Room CP2/5C24
Arlington, VA 22202
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 05 July 2001 (05.07.01)	
International application No. PCT/JP00/06804	**Applicant's or agent's file reference** H822-PCT
International filing date (day/month/year) 29 September 2000 (29.09.00)	**Priority date** (day/month/year) 29 September 1999 (29.09.99)
Applicant YAMANA, Kei et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

[X] in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

27 March 2001 (27.03.01)

[ ] in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election [X] was

[ ] was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO **34, chemin des Colombettes** **1211 Geneva 20, Switzerland**	Authorized officer H. Zhou
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone No.: (41-22) 338.83.38

Form PCT/IB/331 (July 1992)

EP ・ US

特 許 協 力 条 約

PCT

国際調査報告

（法８条、法施行規則第40、41条）
〔ＰＣＴ１８条、ＰＣＴ規則43、44〕

出願人又は代理人の書類記号　Ｈ８２２－ＰＣＴ	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式（ＰＣＴ／ＩＳＡ／２２０）及び下記５を参照すること。	
国際出願番号 ＰＣＴ／ＪＰ００／０６８０４	国際出願日（日.月.年）　２９．０９．００	優先日（日.月.年）　２９．０９．９９
出願人（氏名又は名称） 帝人株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条（ＰＣＴ１８条）の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

１．国際調査報告の基礎

ａ．言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。
☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

ｂ．この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。
☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

２．☐ 請求の範囲の一部の調査ができない（第Ⅰ欄参照）。

３．☐ 発明の単一性が欠如している（第Ⅱ欄参照）。

４．発明の名称は
☒ 出願人が提出したものを承認する。
☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

５．要約は
☒ 出願人が提出したものを承認する。
☐ 第Ⅲ欄に示されているように、法施行規則第47条（ＰＣＴ規則38.2(b)）の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から１カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

６．要約書とともに公表される図は、
第 ＿＿＿ 図とする。☐ 出願人が示したとおりである。　☒ なし
☐ 出願人は図を示さなかった。
☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

国際調査報告[redacted]　　国際出願番号 [redacted]／ＪＰ００／０６８０４

A.　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））
Int.Cl' Ｃ１２Ｎ１５／１２，Ｃ１２Ｑ１／６８，Ｃ１２Ｐ２１／０８，Ｃ１２Ｎ１／１５，Ｃ１２Ｎ１／１９，
Ｃ１２Ｎ１／２１，Ｃ１２Ｎ５／１０

B.　調査を行った分野
調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））
Int.Cl' Ｃ１２Ｎ１５／１２，Ｃ１２Ｑ１／６８，Ｃ１２Ｐ２１／０８，Ｃ１２Ｎ１／１５，Ｃ１２Ｎ１／１９，
Ｃ１２Ｎ１／２１，Ｃ１２Ｎ５／１０

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）
Ｇｅｎｂａｎｋ／ＥＭＢＬ／ＤＤＢＪ／ＧｅｎｅＳｅｑ，ＷＰＩ（ＤＩＡＬＯＧ），ＢＩＯＳＩＳ（ＤＩＡＬＯＧ）

C.　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
PX/PY	WO,2000/29579,A1 (ZYMOGENETICS INC) 25.05月.2000 (25.05.00) &AU,20001622,A	1,4,7,10-27/ 2,3,5,6,8,9
PX/PY	WO,2000/12708,A2 (GENENTECH INC) 09.03月.2000 (09.03.00) Figure2& AU,9955908,A	1,4,7,10-27/ 2,3,5,6,8,9
Y	US,5719125,A(MITUBISI CHEM CORP) 17.11月.1994 (17.11.94) & CA,2122937,A & JP,7-138295,A &EP,624645,A1	1－27

☒ Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。　　☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日　２０．１１．００	国際調査報告の発送日　28.11.00
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ） 郵便番号１００－８９１５ 東京都千代田区霞が関三丁目４番３号	特許庁審査官（権限のある職員） 山村　祥子　　4Ｎ　9217 電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４８８

様式ＰＣＴ／ＩＳＡ／２１０（第２ページ）（１９９８年７月）

国際調査報告[redacted]　　国際出願番号 [redacted]／ＪＰ００／０６８０４

Ｃ（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
Y	EP,869180,A1 (SMITHKLINE BEECHAM CORP) 07.10月.1998 (07.10.98)第15頁第21-32行 & JP,10-323194,A & CA,2232743,A	1－27

147

特 許 協 力 条 約

PCT

REC'D 05 OCT 2001
WIPO PCT

国際予備審査報告

（法第１２条、法施行規則第56条）
〔ＰＣＴ３６条及びＰＣＴ規則70〕

出願人又は代理人の書類記号　Ｈ８２２－ＰＣＴ	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式ＰＣＴ／ＩＰＥＡ／４１６）を参照すること。	
国際出願番号 ＰＣＴ／ＪＰ００／０６８０４	国際出願日 （日.月.年）　２９．０９．００	優先日 （日.月.年）　２９．０９．９９
国際特許分類（ＩＰＣ）Ｉｎｔ．Ｃｌ⁷　Ｃ１２Ｎ１５／１２，Ｃ１２Ｑ１／６８，Ｃ１２Ｐ２１／０８，Ｃ１２Ｎ１／１５，Ｃ１２Ｎ１／１９，Ｃ１２Ｎ　１／２１，Ｃ１２Ｎ５／１０		
出願人（氏名又は名称） 帝人株式会社		

１．　国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条（ＰＣＴ３６条）の規定に従い送付する。

２．　この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で　4　ページからなる。

☐　この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び／又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び／又は図面も添付されている。
（ＰＣＴ規則70.16及びＰＣＴ実施細則第６０７号参照）
この附属書類は、全部で＿＿＿＿＿＿ページである。

３．　この国際予備審査報告は、次の内容を含む。

I　☒　国際予備審査報告の基礎

II　☐　優先権

III　☐　新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成

IV　☐　発明の単一性の欠如

V　☒　ＰＣＴ３５条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明

VI　☒　ある種の引用文献

VII　☐　国際出願の不備

VIII　☐　国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 ２７．０３．０１	国際予備審査報告を作成した日 ２８．０９．０１
名称及びあて先 日本国特許庁（ＩＰＥＡ／ＪＰ） 郵便番号１００－８９１５ 東京都千代田区霞が関三丁目４番３号	特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｎ　３０３８ 鈴木　恵理子　印 電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４８８

様式ＰＣＴ／ＩＰＥＡ／４０９（表紙）（１９９８年７月）

国際予備審査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ００／０６８０４

Ⅰ．　国際予備審査報告の基礎

1．　この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。（法第６条（ＰＣＴ１４条）の規定に基づく命令に応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。ＰＣＴ規則70.16, 70.17）

☒ 出願時の国際出願書類

☐ 明細書　第 ＿＿＿＿＿＿ ページ、
明細書　第 ＿＿＿＿＿＿ ページ、
明細書　第 ＿＿＿＿＿＿ ページ、

出願時に提出されたもの
国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
＿＿＿＿＿＿ 付の書簡と共に提出されたもの

☐ 請求の範囲　第 ＿＿＿＿＿＿ 項、
請求の範囲　第 ＿＿＿＿＿＿ 項、
請求の範囲　第 ＿＿＿＿＿＿ 項、
請求の範囲　第 ＿＿＿＿＿＿ 項、

出願時に提出されたもの
ＰＣＴ１９条の規定に基づき補正されたもの
国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
＿＿＿＿＿＿ 付の書簡と共に提出されたもの

☐ 図面　第 ＿＿＿＿＿＿ ページ／図、
図面　第 ＿＿＿＿＿＿ ページ／図、
図面　第 ＿＿＿＿＿＿ ページ／図、

出願時に提出されたもの
国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
＿＿＿＿＿＿ 付の書簡と共に提出されたもの

☐ 明細書の配列表の部分　第＿＿＿＿＿＿ ページ、
明細書の配列表の部分　第＿＿＿＿＿＿ ページ、
明細書の配列表の部分　第＿＿＿＿＿＿ ページ、

出願時に提出されたもの
国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
＿＿＿＿＿＿ 付の書簡と共に提出されたもの

2．　上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である ＿＿＿＿＿＿ 語である。

☐ 国際調査のために提出されたＰＣＴ規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ ＰＣＴ規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたＰＣＴ規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3．　この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査（または調査）機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査（または調査）機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4．　補正により、下記の書類が削除された。
☐ 明細書　第 ＿＿＿＿＿＿ ページ
☐ 請求の範囲　第 ＿＿＿＿＿＿ 項
☐ 図面　図面の第 ＿＿＿＿＿＿ ページ／図

5．☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。（ＰＣＴ規則70.2(c)　この補正を含む差し替え用紙は上記１．における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。）

Ⅴ．　新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第１２条（ＰＣＴ３５条(2)）に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

１．　見解

新規性（N）　請求の範囲　１－２７　有
請求の範囲　　無

進歩性（ＩＳ）　請求の範囲　　有
請求の範囲　１－２７　無

産業上の利用可能性（ＩＡ）　請求の範囲　１－２７　有
請求の範囲　　無

２．　文献及び説明（ＰＣＴ規則70.7）

請求の範囲１－２７について

文献１：EP 624645 A1 (MITSUBISHI CHEM CORP.) 17.11月.1994(17.11.94)には、ヒトのＣｈＭＩタンパク質及び前記タンパク質をコードするＤＮＡ配列が記載されている。
　また、ヒトＣｈＭＩタンパク質を医薬品として使用する構成や、ヒトＣｈＭＩタンパク質が血管内皮細胞の増殖を抑制する活性を有することが記載されている。

文献２：EP 869180 A1 (SMITHKLINE BEECHAM CORP.) 07.10月.1998(07.10.98) には、ＤＮＡデータベースを使用して既知のＤＮＡ配列と相同性のある遺伝子及びタンパク質の情報を得ることが記載されている。

ＣｈＭＩに類似した新たなポリペプチドを得る目的で、文献１に示されたヒトのＣｈＭＩのアミノ酸配列を用い、文献２に記載されているように既存のＤＮＡデータベースを使用して目的ポリペプチドと相同性を有する新規遺伝子断片を得、その後公知の方法であるＲＡＣＥ法を用いて完全ｃＤＮＡを得て、ＣｈＭＩに類似の新たなポリペプチドを得ることまた前記ポリペプチドに対する抗体を作製することは、当該技術分野の専門家にとっては周知慣用の手段である。
　また、ＣｈＭＩは医薬品として使用可能であることは文献１に記載されており、ＣｈＭＩに類似したポリペプチドとして得られた本願発明のポリペプチドを医薬品として使用することも、当該技術分野の専門家にとっては周知慣用の手段である。

VI.　ある種の引用文献

1.　ある種の公表された文書（PCT規則70.10）

出願番号 特許番号	公知日 （日．月．年）	出願日 （日．月．年）	優先日（有効な優先権の主張） （日．月．年）
WO 2000/29579 A1 [E, X]	25.05.00	12.11.99	13.11.98
WO 2000/12708 A2 [E, X]	09.03.00	01.09.99	01.09.98

2.　書面による開示以外の開示（PCT規則70.9）

書面による開示以外の開示の種類	書面による開示以外の開示の日付 （日．月．年）	書面による開示以外の開示に言及している書面の日付（日．月．年）

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2001 年4 月5 日 (05.04.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/23557 A1

(51) 国際特許分類[7]: C12N 15/12, C12Q 1/68, C12P 21/08, C12N 1/15, 1/19, 1/21, 5/10

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/06804

(22) 国際出願日: 2000 年9 月29 日 (29.09.2000)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願平11/275947 1999 年9 月29 日 (29.09.1999) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 帝人株式会社 (TEIJIN LIMITED) [JP/JP]; 〒541-0054 大阪府大阪市中央区南本町1丁目6番7号 Osaka (JP).

(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 山名 慶 (YAMANA, Kei) [JP/JP]. 高橋幸美 (TAKAHASHI, Yukimi) [JP/JP]. 和田 仁 (WADA, Hitoshi) [JP/JP]. 笠原義典 (KASAHARA, Yoshinori) [JP/JP]; 〒191-0065 東京都日野市旭が丘4丁目3番2号 帝人株式会社 東京研究センター内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 石田 敬, 外 (ISHIDA, Takashi et al.); 〒105-8423 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: NOVEL POLYPEPTIDES AND GENES ENCODING THE SAME

(54) 発明の名称: 新規なポリペプチド及びそれをコードする遺伝子

(57) Abstract: Polypeptides having the amino acid sequences represented by SEQ ID NOS:2, 4 and 6; DNAs encoding the same; antibodies against these polypeptides; and utilization of the same. The above amino acid sequences are homologous with chondromodulin-I which has effects of controlling the proliferation and differentiation of cartilage cells and inhibiting angiogenesis.

(57) 要約:

配列番号：2，4又は6に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチド及びそれをコードするDNA、並びに該ポリペプチドに対する抗体、並びにこれらの使用。上記アミノ酸配列は、軟骨細胞の増殖・分化の調節及び血管新生阻害作用を有するコンドロモジュリンーIに対して相同性を有する。

WO 01/23557 A1

明　細　書

新規なポリペプチド及びそれをコードする遺伝子

発明の分野

本発明は、軟骨細胞の増殖・分化を調節し、血管新生阻害作用を有することが知られているChondromodulin-I（ChM-I）とアミノ酸配列に相同性が認められる新規なヒト、マウス及びラットポリペプチド、並びにそれをコードするヒト、マウス及びラット遺伝子（以下、「ChM1L遺伝子」と略記することがある）に関する。

背景

哺乳類の大部分の骨は、軟骨細胞の増殖、分化を経て石灰化が起こり、最後は骨に置換する、いわゆる「内軟骨骨化」という仕組みによって作られる。この一連の過程には種々のホルモンや成長因子が関与しており、インスリン様増殖因子（IGF1、IGF2）、線維芽細胞増殖因子（FGF）、癌細胞増殖因子（TGF）、成長ホルモンなどが知られている。開らは、前記ホルモンや成長因子の他に軟骨細胞の増殖、分化機能を促進する因子としてChM-I遺伝子を単離した（Biochem. Biophys. Res. Commun., 175, 971-977, 1991、欧州公開特許第473080号公報）。ヒトChM-Iは334アミノ酸残基からなるII型の膜タンパク質として合成され、糖鎖修飾の後、プロセシングを受けて120アミノ酸残基で構成されるC末端部分が細胞外に分泌される（Hiraki et al, Eur. J. Biochem. 260, 869-878, 1999）。ChM-Iは培養軟骨細胞の増殖を促進するのみならず、プロテオグリカン合成、アガロース中での軟骨細胞のコロニー形成を強力に促進する（Inoue et al, Biochem. Biophys. Res. Commun., 241, 395-400, 199

7）。また、ChM-Iは軟骨だけでなく骨芽細胞の増殖をも促進する（Mori et al, FEBS Letters, 406 310-314, 1997）。

一方、軟骨は無血管組織であるばかりでなく血管侵入に対して抵抗性を示すことは古くから指摘されてきた。開らは、軟骨組織抽出物から血管内皮細胞に対する増殖抑制因子の精製を試み、その完全精製に成功した。その結果、これがChM-Iであることが判明した（Hiraki et al, FEBS Letter, 415, 321-324, 1997、Hiraki et al, J. Biol. Chem., 272, 32419-32426, 1997）。軟骨組織は、通常、無血管に保たれているのが特徴であるが、骨組織への置換には軟骨組織への血管侵入が必要であると考えられている。一次骨化中心の形成を準備する血管侵入に先立って、予定血管侵入領域では、軟骨細胞の肥大化と軟骨基質の石灰化がおこる。ChM-Iは肥大化軟骨とこれに続く石灰化軟骨の出現領域で、劇的に発現が消失する。すなわち、ChM-I遺伝子の発現は軟骨特異的であるが、血管侵入に抵抗性を示す無血管軟骨に限局されていることになる。既に述べたように、ChM-Iは、軟骨の増殖と分化成熟を促進するのみならず、血管内皮細胞の増殖阻害により血管侵入を抑制するのではないかと考えられる。従って、無血管軟骨での発現と血管侵入に先立つ石灰化層での発現消失は、ChM-Iのbifunctionalな作用とよく一致している。

また、軟骨組織には強力な血管新生促進因子であるbFGFがpericellular spaceに多量に蓄積されているが、ChM-IはbFGFを取り囲むようにしてinterterritorial spaceに存在することが明らかにされている（Hiraki et al, J. Biol. Chem., 272, 32419-32426, 1997）。すなわち、無血管軟骨では、ChM-Iが血管新生促進因子をマスクするような形で存在しており、ChM-Iの血管新生阻害作用は軟骨に血管が存在しないことを説明し得るものであると考えられている

（蛋白質　核酸　酵素　Vol.40 No.5. 1995）。また、ChM-Iは、in vivoにおいてヒト腫瘍細胞への血管侵入を阻害して、癌細胞の増殖を抑制することが確かめられている（Hayami et al, FEBS Letters, 458, 436-440, 1999）。マウスの各組織におけるChM-IのmRNAの発現解析から、ChM-Iは軟骨以外にも眼と胸腺で発現していることが明らかとなったが、これらの組織におけるChM-Iの機能に関してはいまだ未知である（Shukunami et al, Int. J. Dev. Biol. 43, 39-49, 1999）。

骨折の治癒、各種軟骨疾患の治癒過程には軟骨細胞の増殖、分化機能の発現が重要である。従って、軟骨細胞の増殖と分化を促進する因子であるChM-Iは、軟骨細胞増殖剤としての応用が期待されている（特開平7-138295号公報）。癌細胞の増殖、転移においては、エネルギー獲得のために組織内への血管侵入が必須である。従って、血管新生阻害作用を有するChM-Iは抗腫瘍剤としての応用も期待されている（特開平7-138295号公報）。以上のように、ChM-Iは、軟骨細胞の増殖・分化を制御すると共に、血管新生阻害作用をも有する分子であり、その機能から医薬品への応用が期待されている。

近年、バイオテクノロジーは急速な進歩を続けており、ヒトゲノムプロジェクトの進行とも関連して、大量の新規遺伝子がクローニングされている。ヒト遺伝子は、約10万個存在すると言われているが、その中にはアミノ酸配列に相同性が認められる分子群がファミリーを形成している場合がある。アミノ酸配列に相同性が認められる分子群としては、TNFファミリー、TNFレセプターファミリー、ケモカイン及びG-protein coupled receptorなど多種の遺伝子ファミリーが存在することが知られている。例えば、TNFファミリーに属する分子としては、Tumor necrosis factorα（TNFα、Pennica et al, Nature 312, 724, 1984）、Fas ligand（FasL、Suda et al,

Cell 75, 1167, 1993）、TNF-related apoptosis-inducing ligand（TRAIL、Steven et al, Immmunity 3, 673, 1995）及びB lymphocyte stimulator（BLYS、Moore et al, Science 285, 260-263, 1999）など、約20種類存在することが知られている。

TNFファミリーに属する分子は、II型の膜タンパク質であり、細胞外領域にアミノ酸配列上の相同性が認められる。これらの分子は、アミノ酸配列に相同性が認められるものの、それぞれの分子は固有の機能を有することが明らかにされており、さまざまな疾患に対して医薬品としての適用が試みられている。また、TNFファミリーの分子にはそれぞれ固有のレセプターが存在することが明らかにされており、これらのレセプターも医薬品としての適用が試みられており、実際に医薬品として認可されたものも存在する（例：可溶性TNF受容体，Immunex社）。また、これらの分子に対する抗体も医薬品としての研究開発が進められており、実際に医薬品として承認されたものも存在する（例：抗TNFα抗体、Centocore社）。アミノ酸配列に相同性が認められる分子を医薬品開発へ応用した例として、TNFファミリー及びTNFレセプターファミリーを上記に例として示した。これらの分子の医薬品への応用を可能にした背景には、それぞれの分子の機能解析が実施され、その類似性と差異が明らかにされたことが挙げられる。

また、TNFファミリーの分子は、II型の膜タンパク構造を有する分子であり、主に、血液系、リンパ系の細胞に発現しているものが多いため、実験手法や材料面では共有できる部分が多い。従って、TNFファミリーに属する新規遺伝子が発見された場合には、その機能解析の速度は初期に発見された分子よりも加速したものと思われる。このように、アミノ酸配列に相同性を有する新規遺伝子を発見し、その機能解析を実施することは、今後発見される新規遺伝子の

機能解析の一助となるのみならず、その解析結果により、既知の分子との比較を行うことができるため、既知の分子の機能に関してもより詳細な知見が得られると考えられる。

一般に、既知の分子とアミノ酸配列に相同性が認められるタンパク質をコードする新規遺伝子をクローニングした場合には、機能解析に用いる技術や材料は既知の分子の例を参考にすることができる。しかし、アミノ酸配列に相同性が認められる分子であっても、上記のTNFファミリーのように、それぞれの分子は固有の機能を有していると考えられるため、医薬品への応用を考えた場合には、リコンビナントタンパク質の発現と精製、抗体の作製、各種組織でのmRNA及びタンパク質の発現等を明確にし、既知の分子との構造及び機能面での違いを明らかにすることが必要である。

発明の開示

従って、本発明は、ChM-Iに類似した新たなポリペプチド及びそれをコードする遺伝子を提供することを目的としている。また、本発明においては、該ポリペプチドに対する抗体の作製、各種組織での該遺伝子及びポリペプチドの発現レベルの解析、リコンビナントタンパク質の発現及び構造解析などを実施して、ChM-Iとの類似性と差異を明らかにするとともに、機能を解明し、これらの関与する疾患の病態解明や診断、治療等を可能にすることを目的としている。

ChM-Iは、軟骨細胞の増殖・分化を調節し、血管新生阻害作用を有するII型の膜タンパク質であり、医薬品への応用が期待されている分子である。従って、ChM-Iに類似した新たなポリペプチドをコードする遺伝子が提供できれば、その各種細胞での発現レベルや構造及び機能を解析でき、またその発現物の解析等によりこれらの関

与する疾患の病態解明や診断、治療等が可能となると考えられる。しかしながら、現在のところChM-Iのアミノ酸配列と相同性を示す分子の報告はなく、ChM-Iが遺伝子ファミリーを構成しているのかどうかは不明である。従って、ChM-Iに類似した新たなポリペプチド及びそれをコードする遺伝子の存在が明らかになれば、その構造及び機能等の解析により、ChM-Iとの類似性及び相違性を検討することが可能となり、互いの分子の生理的な機能の解明及びこれらの分子が関与する病態の解明、診断及び治療薬の開発等を加速することも期待される。

本発明者らは、上記目的より鋭意研究を重ねた結果、ヒト、マウス及びラットcDNAライブラリーより新たに、上記目的に合致する遺伝子（ChM1L遺伝子）を単離することに成功し、その各組織での発現レベルの解析、該ポリペプチドに対する抗体の作製、該遺伝子がコードするポリペプチドの哺乳動物細胞での発現、検出及び精製などを実施し、該ポリペプチドが血管新生阻害作用を有することを明らかにして、ここに本発明を完成するに至った。

即ち、本発明は配列番号２、４及び６で表されるアミノ酸配列を実質的に含むポリペプチドをコードする遺伝子である。上記遺伝子としては、例えば配列番号１、３及び５で表される塩基配列が挙げられる。

さらに、本発明は、配列番号２、４及び６で表されるアミノ酸配列を実質的に含む、ヒト、マウス及びラット遺伝子がコードするポリペプチドである。

さらに、本発明は、前記遺伝子の少なくとも一部とハイブリダイズするオリゴヌクレオチドプローブである。

さらに、本発明は、前記遺伝子を含む組換え体DNAである。

さらに、本発明は、前記組換え体DNAによって形質転換された形

質転換体である。

さらに、本発明は、前記形質転換体を培養し、得られる培養物から本発明遺伝子がコードするポリペプチドを採取することを特徴とする前記ポリペプチドの製造方法である。

さらに、本発明は、前記ポリペプチドと特異的に反応するモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体である。

さらに、本発明は、前記ポリペプチドで免疫された抗体産生細胞とミエローマ細胞とを融合させることにより得られる、前記モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマである。

さらに、本発明は、前記オリゴヌクレオチドプローブを含む遺伝子の検出試薬である。

さらに、本発明は、前記ポリペプチド、及び前記モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体を含む診断キットである。

さらに、本発明は、配列番号２、４または６で表されるアミノ酸配列を実質的に含む遺伝子がコードするポリペプチドからなる医薬組成物である。

さらに、本発明は、上記ポリペプチドと特異的に反応するモノクローナル抗体もしくはポリクローナル抗体からなる医薬組成物である。

さらに、本発明は、前記の遺伝子の一部と特異的にハイブリダイズするアンチセンスオリゴヌクレオチドからなる医薬組成物である。

さらに、本発明は、前記の遺伝子の少なくとも一部を含む、遺伝子治療に利用しうる核酸からなる医薬組成物である。

さらに、本発明は、前記のポリペプチドが細胞膜結合型であることを特徴とするポリペプチドである。

さらに、本発明は、前記の細胞膜結合型ポリペプチドをコードす

る遺伝子である。

さらに、本発明は、前記のヒト遺伝子がX染色体に存在することを特徴とする遺伝子である。

さらに、本発明は、前記のポリペプチドが血管新生阻害作用を有することを特徴とするポリペプチドである。

さらに、本発明は、前記の血管新生阻害作用を有するポリペプチドをコードする遺伝子である。

図面の簡単な説明

図１Ａは、ヒトChM1LとヒトChM-Iのアミノ酸配列の相同性を比較した結果を示す。

図１Ｂは、ヒト、マウス及びラットChM1Lのアミノ酸配列の相同性を比較した結果を示す。

図２は、ヒトChM-I、ヒトChM1L及びマウスChM1Lのアミノ酸配列の疎水性プロフィールを示す。

図３は、マウスの成体及び胎児の各組織におけるChM1L mRNAの発現解析、並びにマウスの胎児発生段階におけるChM1L及びChM-I mRNAの発現解析の結果を示す。

図４は、COS7細胞においてヒト及びマウスChM1Lタンパク質を発現させ、Western blotにより検出した結果を示す。（ａ）は、Mock（レーン１）、ヒトChM1L（レーン２）及びマウスChM1L（レーン３）をトランスフェクトして細胞成分を電気泳動後、クーマシーブリリアントブルー染色した結果を、（ｃ）は同サンプルを抗ChM1Lペプチド抗体を用いたWestern blotにより検出した結果を示す。（ｂ）は、Mock（レーン１）、ヒトChM1L（Hisタグ付き）（レーン２）及びマウスChM1L（Hisタグ付き）（レーン３）をトランスフェクトして細胞成分を電気泳動後、クーマシーブリリアントブルー染色し

た結果を、（ｄ）は同サンプルを抗Hisタグ抗体を用いたWestern blotにより検出した結果を示す。

図５は、COS7細胞において発現させた可溶性ChM1L（レーン２）及びMock（レーン１）を抗FLAG M2抗体を用いたWestern blot法により検出した結果を示す。

図６は、COS7細胞においてマウスChM1L（Hisタグ付き）タンパク質を発現させ、細胞成分を回収して糖鎖消化反応を行い、抗Hisタグ抗体を用いたWestern blotによりChM1Lタンパク質を検出し糖鎖構造の解析を行った結果を示す。レーン１は未処理、レーン２はNANase II + O-glycosidase DS + PNGase処理、レーン３はNANase II処理、レーン４はO-glycosidase DS処理、レーン５はPNGase処理のサンプルのWestern blotの結果を示す。

図７は、マウスの肋軟骨組織におけるChM1Lタンパク質の発現を、抗ChM1Lポリペプチド抗体を用いた免疫染色により検出した結果を示す。

図８は、COS7細胞の培養液中に発現させた可溶性ヒトChM1Lタンパク質を、抗FLAG M2アフィニティーゲルを用いたアフィニティークロマトグラフィーにより精製し、電気泳動後、クーマシーブリリアントブルー染色した結果を示す。レーン１は、COS7細胞の培養上清、レーン２は精製したChM1Lタンパク質の電気泳動の結果を示す。

図９は、ヒト臍帯静脈内皮細胞の管腔様構造形成系に、（ａ）バッファーのみ、（ｂ）BSA(bovine serum albumin) 20ug、（ｃ）可溶性ヒトChM1L 10ug、（ｄ）可溶性ヒトChM1L 20ug、（ｅ）PF-4（platelet factor 4）1ug、（ｆ）PF-4 10ugを処理した結果を示す。

発明の実施の形態

本発明において、「実質的に含む」とあるのは、本発明の遺伝子又はポリペプチドは、その機能を有する限り、配列番号１、３または５で表される塩基配列、あるいは配列番号２、４または６で表されるアミノ酸配列に置換、挿入又は欠失等の変異が生じてもよいことを意味する。

本発明のChM1L遺伝子配列は、RACE（RACE：Rapid amplification of cDNA ends；Frohman, M. A. et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 8998-9002, 1988）法により取得することができるが、その概要を述べれば次のとおりである。

一般的に、RACE法とは、cDNAの一部の配列が既知である場合、これをもとに完全長cDNAを効率よく取得する方法である。既知の配列領域から3’末端あるいは5’末端それぞれの方向に伸長できるようにプライマーを作製し、PCR（Polymerase Chain Reaction、Science, 230, 1350-1354, 1985）法により、cDNAを増幅する。PCR法を実施する際は、既知領域では特異的にアニールするプライマー、3’末端及び5’末端ではライゲーション反応等により付加した配列にアニールするプライマーを用いる。従って、PCR法により増幅させた領域は配列が未知の領域を含んでいる。増幅させたDNA断片の単離・精製は後述の実施例でも述べるとおり常法に従うことができ、例えばゲル電気泳動等によればよい。このようにして得られたDNA断片等の塩基配列の決定も、常法に従うことができ、例えばジデオキシ法（Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463-5467, 1977）やマキサム-ギルバート法（Methods in Enzymology, 65, 499, 1980）等により行うことができる。かかる塩基配列の決定は、市販のシークエンスキット等を用いても容易に行い得る。

より具体的には、本発明における後述の実施例２で詳細に述べる

が、概略は以下の通りである。ヒトChM-Iのアミノ酸配列を用いて、日本DNAデータバンク（DDBJ：DNA data bank of Japan）において、ESTデータベース（dbEST、EST：Expressed sequence tag）でTBLASTNサーチを実施し、ESTファイル、Genbank accession number AI123839を検出した。AI123839は、dbESTに登録された塩基配列断片であるが、前記のTBLASTNサーチによりはじめてChM-Iに類似したアミノ酸配列をコードする新規遺伝子断片であることが明らかとなった。そこで、このdbESTより得たcDNAの一部の配列よりプライマーを合成し、RACE法を用いてヒトChM1L遺伝子の配列を決定するに至った。その後、同様にマウス及びラットChM1L遺伝子の配列を決定した。ヒト、マウス及びラットChM1L遺伝子の配列を配列番号1、３及び５に、それがコードするポリペプチドのアミノ酸配列を配列番号２，４及び６に示す。

本発明のChM1L遺伝子がコードするポリペプチドは、317アミノ酸で構成される（配列番号２，４及び６）。ChM1Lのアミノ酸配列はChM-Iと相同性を有するが、特にChM-Iのプロセシングを受けて細胞外に分泌されるC末端部分と非常に高い相同性を有する（図１(a)）。また、ChM1Lのアミノ酸配列はヒト、マウス及びラットの間で非常に高い相同性を有する（図１(b)）。アミノ酸配列の疎水性度の解析から、ChM1LはChM-Iと同様にII型の膜タンパク構造を有する分子であると考えられる（図２）。図２に示すように、該ポリペプチド及びChM-Iは共に、膜結合性を有する分子に特徴的に認められる約20アミノ酸からなる疎水性のドメインが、N末端から数十アミノ酸付近に存在する。該ポリペプチドがII型の膜タンパク構造を有する分子であることは、該ポリペプチドをCOS7細胞に発現させた実施例８の結果からも明らかにされた（図４）。

本発明のヒトChM1L遺伝子は、後述の実施例１２で述べるとおり

ヒトX染色体に存在することが明らかとなった（Genbank accession No. AL035608）。

本発明のChM1L遺伝子は、cDNA、化学的に合成されたDNA、PCRによって単離されたDNA、ゲノムDNA及びそれらの組み合わせがある。該ゲノムDNAは標準的な技法を用いて、本明細書中に開示されたChM1L遺伝子に対するハイブリッド形成によっても単離することができる。該ChM1L遺伝子から転写されたRNAもまた、本発明によって包含される。配列番号１、３及び５で示される本発明遺伝子の配列は、これによりコードされる各アミノ酸残基を示すコドンの一つの組み合わせ例であり、本発明のChM1L遺伝子はこれに限らず、各アミノ酸残基に対して任意のコドンを組み合わせ選択したDNA配列を有することも勿論可能である。該コドンの選択は常法に従うことができ、例えば利用する宿主のコドン使用頻度を考慮することができる（Nucleic Acids Research, 9, 43-74, 1981）。

さらに本発明のChM1L遺伝子には、配列番号２、４及び６で表されるアミノ酸配列の一部が置換、欠失、付加した変異体をコードするDNA配列もまた包含される。これらポリペプチドの製造、改変（変異）等は、天然に生じることもあり、また翻訳後の修飾により、或いは遺伝子工学的手法により、例えばサイトスペシフィック・ミュータジェネシス（Methods in Enzymology, 154, 350, 367-382, 1987；同100, 468, 1983；Nucleic Acids Research, 12, 9441, 1984；続生化学実験講座１「遺伝子研究法II」，日本生化学会編，105, 1986）等の方法により収得することができる。

本発明のChM1L遺伝子の製造は、本発明のChM1L遺伝子の配列情報に基づいて、一般的遺伝子工学的手法により容易に実施できる（Moleculer Cloning 2nd ED, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989；続生化学実験講座「遺伝子研究法 I、II、III」、日本生化

学会編，1986等参照）。

これは例えばcDNAライブラリー（ChM1L遺伝子の発現される適当な起源細胞より常法に従い調製されたもの）から、本発明遺伝子に特有の適当なプローブや抗体を用いて所望クローンを選択することにより実施できる（Proc.Natl.Acad.Sci.USA，78，6613，1981；Science，222，778，1983等）。

上記方法において、起源細胞としては、ChM1L遺伝子を発現する各種の細胞、組織やこれらに由来する培養細胞等が例示され、これらからの全RNAの分離、mRNAの分離や精製、cDNAへの変換（合成）とそのクローニング等はいずれも常法に従い実施できる。また、cDNAライブラリーは市販されてもおり、本発明ではそれらcDNAライブラリー、例えばクローンテック社より市販の各種cDNAライブラリー等を用いることもできる。

cDNAライブラリーからの本発明のChM1L遺伝子のスクリーニングは前記通常の方法に従い実施することが出来る。該スクリーニング方法としては、例えばcDNAの産生するポリペプチドに対して、本発明のChM1L遺伝子がコードするポリペプチドに対する特異的抗体を使用した免疫的スクリーニングにより対応するcDNAクローンを選択する方法、目的の塩基配列に選択的に結合するプローブを用いたプラークハイブリダイゼーション、コロニーハイブリダイゼーション等やこれらの組み合わせを例示できる。ここで用いられるプローブとしては、本発明のChM1L遺伝子のDNA配列に関する情報をもとにして化学合成されたDNA配列、既に取得された本発明のChM1L遺伝子やその断片がかかるプローブとして利用できる。

また、本発明のChM1L遺伝子の取得に際しては、PCR法によるDNA/RNA増幅法が好適に利用できる。かかるPCR法の採用に際して使用されるプライマーは、既に本発明によって明らかにされた本発明のCh

M1L遺伝子の配列情報に基づいて適宜設定することができ、これは常法に従い合成することができる。

より具体的には、実施例２で詳細に述べるが概略は以下のとおりである。ChM1L遺伝子のcoding sequenceを含むようにプライマーを合成し、これを用いてPCR法によりChM1L遺伝子を増幅する。その後、アガロース電気泳動を行い、目的のバンドを切り出した後、DNAを精製する。精製したDNAとプラスミドベクターをligation反応させ、大腸菌で形質転換を行う。その後、大腸菌培養液よりプラスミドを精製し、DNAシークエンサーにより目的の配列が組み込まれたことを確認する。このようにしてクローニングされたChM1L遺伝子は、適切な制限酵素を用いることにより、他のプラスミドベクターやウィルスベクターに移しかえることが可能である。

このようにして得られたChM1L遺伝子（cDNA及びゲノムDNA）を利用すれば、常法に従い、ChM1L遺伝子の発現が増加、減弱及び消失した遺伝子改変動物を作成することが可能である。

本発明のChM1L遺伝子の配列情報を基にすれば、該遺伝子の一部又は全部の塩基配列を利用することにより、各種組織における本発明のChM1L遺伝子の発現を検出することができる。これは常法に従って行うことができ、例えばRT-PCR（Reverse transcribed-polymerase chain reaction）（Kawasaki, E.S., et al., Amplification of RNA. In PCR Protocol, A Guide to methods and applications, Academic Press, Inc., SanDiego, 21-27, 1989）法、ノーザンブロッティング解析（Molecular cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989）等により、いずれも良好に実施しうる。RT-PCR法のプライマー及びノーザンブロッティング解析のプローブは、ChM1L遺伝子を特異的に検出しうる配列である限り何ら制限はなく、かかる配列は本発明のChM1L遺伝子の塩基配列により適宜設定するこ

とが可能である。従って、本発明は、ChM1L遺伝子の検出に有用なプライマー及び／またはプローブを提供するものである。尚、該プローブは、サザンブロッティンング解析によるゲノムDNAの検出にも利用可能である。

ChM1L mRNAの発現を検出する手段としては、実施例６で述べるRT-PCR法を例示できる。詳細は実施例６で述べるが、概略は以下のとおりである。

各組織を摘出してRNAを抽出した後、逆転写反応によりcDNAを合成する。このcDNAをテンプレートにしてPCR反応を行い、得られた反応液をアガロースゲルで電気泳動し、紫外線照射下でバンドを観察することにより、各組織でのChM1L遺伝子の発現量を検出した。その結果、成体マウスの各組織におけるChM1L mRNAの発現は、脳、眼球、骨格筋、whole rib及び甲状腺で認められた（図３(a)）。一方、マウスにおけるChM-I mRNAの発現は、眼球、胸腺、軟骨及びwhole ribで確認されている（Shukunami et al, Int. J. Dev. Biol 43, 39-49, 1999）。従って、ChM1LとChM-Iは生体内において異なる組織に発現していることが明らかとなり、その生理的な機能は異なると考えられた。ChM1Lは、ChM-Iでは発現が確認されていない組織である脳、骨格筋及び甲状腺で発現が認められた。

また、ChM-Iでも発現が認められている組織であり、血管侵入に対して抵抗性のある組織である眼球及び軟骨を含むwhole ribで発現していることから、ChM1Lは血管新生に関与していると考えられる。これらの結果からChM1Lは、アルツハイマー病等の脳が関連した疾患、筋ジストロフィー等の骨格筋が関連した疾患、バセドウ病などの甲状腺が関連した疾患、糖尿病性網膜症等の眼球が関連した疾患、変形性関節症やリウマチ性疾患などの軟骨組織が関連した疾患及び癌を含む血管新生が関連した疾患に関与していると考えられ

る。従って、本発明のChM1L遺伝子、ChM1Lポリペプチド、ChM1Lに結合する抗体を含むChM1Lに対するアンタゴニスト及びアゴニスト、ChM1L遺伝子の発現を促進あるいは減弱させる物質等をこれらの疾患の治療薬として適用することができると考えられる。尚、ここで挙げたアゴニストやアンタゴニストなどの物質は、ペプチド、タンパク質及び低分子化合物などが考えられ、その機能を有する限り物質の性状に制限はないものとする。

胎児の各組織においてChM1L mRNAの発現は、眼球、腎臓、胃、whole rib及び気管で認められた（図３(b)）。成体マウスでは、腎臓及び胃でのChM1L mRNAの発現は認められていないが、胎児においてこれらの組織にChM1L mRNAが発現していることは、これらの臓器の発生・形態形成にChM1Lが関与していることを示しているものと考えられる。従って、ChM1Lは、成体においてもこれらの臓器の修復や再生にも関与していると考えられる。また、気管においてもChM1L mRNAが発現していることが明らかとなった。従って、本発明のChM1L遺伝子、ChM1Lポリペプチド、ChM1Lに結合する抗体を含むChM1Lに対するアンタゴニスト及びアゴニスト、ChM1L遺伝子の発現を促進あるいは減弱させる物質等を、慢性腎不全等の腎臓が関連した疾患、胃がんや胃潰瘍などの胃が関連した疾患及び慢性気管支炎や喘息などの気管が関連した呼吸器系疾患に対する治療薬として適用することができると考えられる。

胎児発生段階においてChM1L mRNAの発現は、妊娠１０日目では非常に弱く、１１日目から１３日目にかけて発現が上昇している（図３(c)）。一方、ChM-IもChM1Lと同様に胎児の発生に伴って発現が上昇するが、妊娠１０日目及び１１日目では明らかにChM1Lよりも強い発現を示した。従って、胎児発生段階において、ChM1LはChM-Iよりも遅れて発現が上昇することが明らかとなり、両分子が胎児発

生において異なる機能を有することが明らかとなった。また、胎児発生段階においてChM1Lの発現が上昇することは、ChM1Lが臓器や骨格の形成に深く関与していることを示している。従って、本発明のChM1L遺伝子、ChM1Lポリペプチド、ChM1Lに結合する抗体を含むChM1Lに対するアンタゴニスト及びアゴニスト、ChM1L遺伝子の発現を促進あるいは減弱させる物質等は、臓器の不十分な発達による先天性疾患や後天的に臓器が損傷した場合に、臓器を再生及び修復させる薬剤として適用できるものと考えられる。また、ChM1LとChM-Iでは成体及び胎児の各組織における発現、胎児発生段階における発現に違いが認められることから、これらの分子及びこれらの分子をターゲットにした薬剤を各種疾患の治療薬として適用する場合には、その用途は異なる場合があると考えられる。

本発明のChM1L遺伝子の配列を使用すれば、遺伝子工学的手法により該遺伝子がコードするポリペプチドを製造することが可能である。

該ポリペプチドの製造は、本発明のChM1L遺伝子が宿主細胞中で発現できる組換え体DNAを作製し、これを宿主細胞に導入して形質転換し、該形質転換体を培養することにより行われる。
ここで宿主細胞としては、真核性宿主細胞及び原核性宿主細胞のいずれを用いることもできる。

該真核性宿主細胞には、脊椎動物、酵母及び昆虫細胞等が含まれる。脊椎動物細胞としては、例えばCHO細胞及びCOS細胞等が挙げられる。

脊椎動物の発現ベクターとしては、通常発現しようとする遺伝子の上流に位置するプロモーター、ポリアデニル化部位及び転写終了配列等を保有するものを使用できる。該発現ベクターとしては例えば、SV40の初期プロモーターを保有するpSV2dhfr (Mol. Cell. Bio

1., 854, 1981）、pcDNA3.1(+)（Invitrogen社）及びpCAGGS（Gene, 108, 193-200, 1991）等を例示できる。

真核細胞中で目的ポリペプチドを発現させる手段は、それ自体当該分野では多くの系が周知である。

例えば酵母中で発現させる系としては特開昭57-159489号公報に記載された「酵母中でのポリペプチドの発現」が挙げられ、昆虫細胞中で発現させる系としては特開昭60-37988号公報に記載された「組換えバキュロウイルス発現ベクターの製法」が挙げられ、哺乳類動物細胞中で発現させる系としては特開平2—171198号公報に記載された「真核性発現の改良」が挙げられるが、もちろんこれら以外にも多数存在する。

本発明ChM1L遺伝子は、例えば、大腸菌、枯草菌およびストレプトマイセス等の原核性宿主細胞内でも発現し得る。例えば、上記宿主としての大腸菌はEcherichia coli K12株等がよく用いられ、ベクターとしてはpBR322及びその改良ベクターがよく用いられるが、これらに限定されず公知の各種菌株及びベクターも利用できる。プロモーターとしては、例えば、大腸菌ラクトース（lac）、大腸菌trp等のプロモーターが挙げられるがこれらに限定されない。また、上記のプロモーターは、いずれも既に特性化されており、当業者が熟知しているものであって、合成的にあるいは、既知のプラスミドから組み立てることができるものである。

本発明の例示DNA配列、プラスミドおよびウイルスには多くの修飾や変更が可能である。例えば、遺伝暗号の同義性により、ポリペプチドの暗号領域全体を通して、ヌクレオチドの置換を行うことができる。そのような配列は、本発明ChM1L遺伝子の塩基配列又はそれがコードするポリペプチドのアミノ酸配列から推定することができ、下記の従来からの合成法により組み立てることができる。その

ような合成法は、実質上、イタクラらの方法（Itakura et al, Science 198, 1059, 1977）ならびにクレアらの方法（Crea et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 5765, 1978）に従って行うことができる。従って、本発明は特に例示した塩基配列、プラスミドおよびウイルスに限定されるものではない。

かくして得られる所望の本発明の組換え体DNAの宿主細胞への導入方法及びこれによる形質転換方法としては、一般的な各種方法を採用できる。また、得られる形質転換体は常法に従い培養でき、該培養により本発明のChM1L遺伝子がコードするポリペプチドが生産される。該培養に用いられる培地としては、採用した宿主細胞に応じて慣用される各種のものを適宜選択でき、その培養も宿主細胞の成育に適した条件下で実施できる。

上記により、形質転換体の細胞内、細胞外あるいは細胞膜上に該ポリペプチドが生産される。該ポリペプチドは、所望によりその物理学的性質、化学的性質等を利用した各種の分離操作[「生化学データブックII」、1175-1259頁、第1版第1刷、1980年6月23日株式会社東京化学同人発行；Biochemistry, 25(25), 8274-8277 (1986); Eur. J. Biochem., 163, 313-321 (1987)等参照]により分離、精製できる。該方法としては、具体的には例えば通常の再構成処理、ポリペプチド沈澱剤による処理（塩析法）、遠心分離、浸透圧ショック法、超音波破砕、限外ろ過、ゲルろ過、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）等の各種液体クロマトグラフィー、透析法、これらの組合わせ等を例示できる。また、該ポリペプチドにアフィニティータグを融合したタンパク質を発現させれば、このタグを利用してアフィニティー精製を実施することが可能である。ここで述べるアフィニティータグとは例えば、ポリ

ヒスチジンタグ（Hisタグ、Sisk et al, J. Virol. 68, 766, 1994）及びFLAGタグ（Hopp et al, Biotechnology 6, 1204-1210, 1988）が挙げられる。これらのアフィニティータグを融合したChM1Lポリペプチドの発現及び検出は、実施例８及び９で述べるように実施することが可能であり、これらのタグを用いてChM1Lポリペプチドを精製することも実施し得る。

本発明のChM1L遺伝子がコードするポリペプチドの製造方法は、より具体的には実施例８で詳細に述べるが概略は以下のとおりである。

本発明のヒト及びマウスChM1L遺伝子及びC末端にHisタグが融合したChM1Lタンパク質をコードする遺伝子をpcDNA3.1(+)ベクターにクローニングし（実施例４）、これをCOS7細胞にトランスフェクトした。約４８時間後に、培養上清及び細胞成分を回収してWestern blot法によりChM1Lリコンビナントタンパク質の検出を試みた。しかし、培養上清及び細胞成分のいずれにおいてもChM1Lタンパク質の発現を検出することはできなかった。

そこで、ChM1Lリコンビナントタンパク質の発現を検出する条件を検討したところ、発現ベクターにpCAGGSを使用することによりCOS7細胞での該ポリペプチドの発現を検出することが可能となった。本発明のヒト及びマウスChM1L遺伝子及びC末端にHisタグが融合したChM1Lタンパク質をコードする遺伝子をpCAGGSベクターにクローニングし（実施例４）、これをCOS7細胞にトランスフェクトした。約４８時間後に、培養上清及び細胞成分を回収してWestern blot法によりChM1Lリコンビナントタンパク質を検出した。培養上清ではChM1Lタンパク質の発現は確認されず、細胞成分では40kDa付近に２本のバンドが検出された。

従って、ChM1Lタンパク質は膜結合性タンパク質であることが明

らかになった。一方、ChM-IをCOS7細胞で発現させると培養上清中に可溶性のタンパク質として分泌されることが確認されている（Hiraki et al, J. Biol. Chem., 272, 32419-32426, 1997）。従って、COS7細胞による解析からChM1LとChM-Iは異なる構造を有するタンパク質であることが明らかとなった。すなわち、ChM1Lは細胞膜結合型のタンパク質であり、ChM-Iは分泌性のタンパク質であり、両分子のプロセシングの機構が異なることが明らかとなった。尚、ChM1Lタンパク質の２本のバンドのうち、高分子量側のバンドは、N結合型の糖鎖により修飾されたフォームであることが、後述する実施例１０により明らかになった（図６）。

このようにして発現させたChM1Lタンパク質は、ChM1L特異的抗体あるいはヒスチジンが６残基融合したタグ（Hisタグ）などに対する抗体及びニッケルカラムなどを用いてアフィニティー精製することが可能である。

本発明のChM1L遺伝子がコードするポリペプチドは、膜結合性ポリペプチド及び細胞膜結合性を有しない可溶性のポリペプチドでもあり得る。例えば、細胞膜上に膜結合性ポリペプチドとして発現した後、切断されて可溶性になる場合等が考えられる。COS7細胞における発現ではChM1Lタンパク質は膜結合型のタンパク質として検出されたが（実施例８）、宿主細胞や培養条件などが異なればプロセシングを受けて可溶性タンパク質となることもありうる。また、膜貫通領域を欠く可溶性の該ポリペプチドは、異種シグナルペプチドをN末端に融合することにより発現させることができる。

より具体的には、実施例９で詳細に述べるが可溶性のChM1Lタンパク質を発現させる方法の概略は以下のとおりである。

pCAGGSベクターにN末側から、プレプロトリプシンのシグナルシークエンス、FLAGタグ、ChM1Lの細胞外領域のC末端側が融合したタ

ンパク質コードする塩基配列を組み込んだベクターを構築した（実施例５）。このベクターを用いて発現させたChM1Lタンパク質は、プレプロトリプシンのシグナルシークエンスが切断を受けた後、可溶性タンパク質として培養液中に分泌された（実施例９、図５）。

このようにして培養液中に分泌された可溶性のChM1Lポリペプチドは、抗ChM1L抗体あるいは、FLAGタグが融合しているため抗FLAG抗体（Sigma社）を用いて精製することが可能である。また、FLAG融合タンパク質をエンテロキナーゼで切断することにより、FLAGタグを除去することも可能である。

より具体的には、実施例１３で詳細に述べるが可溶性ChM1Lタンパク質の精製方法の概略は以下のとおりである。

リポフェクトアミン試薬（GIBCO BRL社）を用いて製品説明書に従って、pSF-shChM1LをCOS7細胞にトランスフェクトして約４８時間後に培養上清を回収した。この培養上清から、抗FLAG M2アフィニティーゲル（Sigma社）を用いたアフィニティークロマトグラフィーにより、可溶性ヒトChM1Lタンパク質を精製した（図８）。

本発明のChM1Lポリペプチドは、ポリペプチド精製試薬として用いることができる。固体支持材料に結合した該ポリペプチドは、アフィニティークロマトグラフィーによる該ポリペプチドに結合し得るポリペプチドの精製に有用である。ChM1Lポリペプチドに結合し得るポリペプチドとしては、可溶性ポリペプチド、膜結合性ポリペプチド及び抗体などが考えられる。可溶性のChM1Lポリペプチドは、in vitroでは細胞培養液中への添加、in vivoでは静脈内投与などに容易に適用し得る。

本発明ChM1Lポリペプチドの活性を検索する目的で、ヒト臍帯静脈内皮細胞（Human Umbilical Vein Endothelial Cells:HUVECs)を用いて血管新生阻害作用の有無を解析した。詳細は、後述の実施例

１４で述べるが概略は以下のとおりである。HUVECsをマトリゲル（BECTON DICKINSON)でコートしたプレート上で培養すると、血管内皮細胞が管腔様の構造を形成する（図９）。この培養液中に、前述のアフィニティークロマトグラフィーにより精製したChM1Lポリペプチドを加えるとHUVECsの管腔様構造の形成が阻害された（図９）。従って、ChM1Lは血管新生阻害作用を有することが明らかとなり、可溶性のChM1Lポリペプチドは糖尿病性網膜症、癌、慢性関節リウマチなどの血管新生を伴う疾患の治療薬として適用できることが明らかとなった。

本発明のChM1L遺伝子がコードするポリペプチドは、これを用いて特異抗体を作製することもできる。ここで使用される抗原は、上記遺伝子工学的手法に従って大量に産生されるポリペプチド又は化学的に合成されたポリペプチドがあり、得られる抗体はポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体のいずれでもよく、これらの抗体は該ポリペプチドの精製、測定、識別等に有効に利用できる。従って、該ポリペプチドに対するポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体は該ポリペプチドによって（直接的に又は間接的に）媒介される疾患の治療及び治療法の開発に使用することができ、上記疾患の診断用試薬として使用することも可能である。

本発明のChM1L遺伝子がコードするポリペプチドに特異的に結合する抗体は、実施例７に示すように作製することができる。作製した抗ChM1Lポリペプチド抗体が該ポリペプチドと特異的に結合することは、実施例８のWestern blotの結果により確かめられた（図４）。

抗ChM1Lポリペプチド抗体は、実施例１１に示したように組織切片の免疫染色にも使用可能である。肋軟骨組織を抗ChM1Lポリペプチド抗体を用いて染色すると、軟骨組織周囲を取り囲むようにして

存在する線維芽細胞様の扁平な形態を示す細胞が特異的に染色された（図７）。一方、ChM-Iは軟骨細胞に特異的に発現しており、免疫染色によっても軟骨細胞及び軟骨細胞外のマトリックスに蓄積されていることが明らかにされている（Hiraki et al, J. Biol. Chem., 272, 32419-32426, 1997）。従って、ChM1LとChM-Iは軟骨を含む組織において異なる細胞に発現していることが明らかとなった。従って、ChM1LはChM-Iと異なる機能を有する分子であることが明らかとなった。

免疫染色によってChM1Lタンパク質を発現していることが明らかになった線維芽細胞様の形態を示す細胞群を含む組織は、従来より軟骨膜（perichondrium）と呼ばれている（Suda et al, 骨形成と骨吸収及びそれらの調節因子１、２, 1995）。軟骨膜という組織に関しては現在のところ明確な定義はないが、本明細書中では軟骨細胞周囲を取り囲む線維芽細胞様の形態を示す細胞を含む組織のことを指すものとする。

軟骨膜に存在する細胞は、内軟骨性骨化の過程で軟骨組織が成長する際の軟骨細胞の供給源であると考えられている。従って、軟骨膜は発生過程における骨格形成や成体における骨、軟骨の損傷時に軟骨細胞を供給する重要な組織である。また、軟骨組織には血管、神経、リンパ管が存在しないことが特徴であるが、軟骨組織と他の組織の境界に存在するのが軟骨膜であることから、軟骨膜は軟骨細胞への血管、神経、リンパ管の侵入を制御していると考えられる。このように、軟骨膜は重要な組織であることが認識されているが、上述のように明確に定義された組織ではなく、現在のところ詳細な研究は行われていない。その理由としては、軟骨膜特異的に発現する分子が全く明らかにされていないことが挙げられる。

従って、軟骨組織周囲を取り囲む軟骨膜と呼ばれる組織に特異的

に発現する分子の存在が明らかになれば、軟骨膜及び軟骨組織の研究に非常に重要なツールとして利用できる。

本発明のChM1Lは、軟骨膜特異的に発現していることが明らかにされた唯一の分子であり、血管、神経、リンパ管の軟骨組織への侵入を制御していると考えられる。

従って、ChM1L遺伝子の発見と本発明に含まれるChM1Lの機能解析の結果は、今後、軟骨膜及び軟骨組織を含むChM1Lが発現しているその他の組織が関与する疾患の原因や治療法の開発に新たな視点を与えうるものであると考えられる。

従って、本発明のChM1L遺伝子、ChM1Lポリペプチド、ChM1Lに結合する抗体を含むChM1Lに対するアンタゴニスト及びアゴニスト、ChM1L遺伝子の発現を促進あるいは減弱させる物質等は、上記のChM1Lを発現している細胞が関与している疾患の治療薬として適用することができると考えられる。

本発明のChM1L遺伝子及びそれがコードするポリペプチドは、上記のmRNAの発現解析及び免疫染色の結果から、脳、眼球、骨格筋、甲状腺、軟骨を含むwhole rib、腎臓、胃、気管及び軟骨組織周囲を取り囲むようにして存在する線維芽細胞様の扁平な形態を示す細胞に発現していることが明らかとなった。従って、本発明のChM1L遺伝子及びそれがコードするポリペプチドは、それが発現していることが確認された上記の組織が関連する疾患、例えば糖尿病性網膜症、筋ジストロフィー、バセドウ病、慢性腎不全、胃癌、慢性気管支炎、変形性関節症及びリウマチ性疾患などに関与していると考えられる。

従って、本発明のChM1L遺伝子、ChM1Lポリペプチド、ChM1Lに結合する抗体を含むChM1Lに対するアンタゴニスト及びアゴニスト、ChM1L遺伝子の発現を促進あるいは減弱させる物質等はこれらの疾患

に対する治療薬として適用することができると考えられる。

実施例

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、これらの実施例は本発明の範囲を限定するためのものでない。

実施例１．ChM1Lアミノ酸配列の解析

ChM-IとChM1Lのアミノ酸配列の相同性を比較した（図１(a)）。尚、アミノ酸配列はアルファベット１文字で表示した。ChM1Lは、分子全体を通してChM-Iと相同性を有するが、ChM-Iのプロセシングを受けて細胞外に分泌されるC末側と特に高い相同性を有することが明らかになった。

ヒト、マウス及びラットChM1Lのアミノ酸配列の相同性を比較した（図１(b)）。ChM1Lポリペプチドは、ヒト、マウス及びラットともに、317アミノ酸で構成されるが、３種間で300アミノ酸残基が同一であった（約95%）。

ChM-IとChM1Lの疎水性度の図を示す（図２）。ChM-I及びChM1L共にN末側に疎水性の大きなピークが認められる。この疎水性の領域は、細胞膜結合型のタンパク質に特徴的に認められるものであり、ChM1LはChM-Iと同様にII型の膜結合性タンパク質であることが示された。

実施例２．ChM1L遺伝子のクローニング

日本DNAデータバンク（DDBJ：DNA data bank of Japan）から、ヒトChM-Iのアミノ酸配列（Genbank accession number M16441）を用いて、Expressed sequence tag データベース（dbEST）上でTBLASTNサーチを実施した。その結果、ChM-Iと相同性を有する新規遺伝子断片として、ESTファイル、Genbank accession number AI123839を検出した。

クローンテック社製Human fetus Marathon-Ready™ cDNAを用い

て製品説明書に従い、RACE法によりcDNAの増幅を行った。プライマーは上記のdbESTより得られた塩基配列より合成し、ExTaq plymerase（宝酒造）を製品説明書に従って使用し、GeneAmp® PCR System 9700（PE Applied Biosystems社）を用いて、反応サイクルは96℃ 30秒、60℃ 30秒、72℃ 1分を30回繰り返すこととし、最後に72℃で6分間インキュベートしてPCR反応液を得た。この反応液をテンプレートとして1/10量加え、同条件で２度目のPCR行った。

得られたPCR産物をエチジウムブロマイド入りの1%アガロースゲルで電気泳動を行い、このゲルを紫外線下で観察することによりDNAバンドを調べた。増幅されたフラグメントをゲルから切り取り、製品説明書に従い、QIAquick Gel Extraction Kit（QIAGEN社）を用いて精製した。

精製フラグメントの塩基配列は製品説明書に従い、PE Applied Biosystems社製DNAシークエンサー（ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer）及びABI PRISM™ BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kitを用いて決定した。

ヒトChM1L cDNAの核酸塩基配列を配列番号１に、アミノ酸配列を配列番号２を示す。

配列番号１で表されるヒトChM1L遺伝子によりコードされるアミノ酸配列が、ヒトChM-Ｉと相同性を示すことから、この遺伝子をChM1L遺伝子（ChM-I like gene）と呼ぶこととした。

ヒトChM1L cDNAのcoding sequence（CDS）をPCRにより増幅、アガロース電気泳動後、精製し、pCR-Script™ Ampクローニングキット（Stratagene社）を用いて製品説明書に従ってクローニングした。PCRに用いたプライマーの配列を配列番号７（Forward primer）及び配列番号８（Reverse primer）に示した。ベクターに組み込まれたChM1L遺伝子配列は製品説明書に従い、ABI PRISM™ 310 Genet

ic Analyzer (PE Applied Biosystems社) 及びABI PRISM™ BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kitを用いて決定した。

ヒトChM1Lのアミノ酸配列（配列番号２）を用いて、上記ヒトの場合と同様にTBLASTNサーチを実施した。その結果、マウスChM1Lをコードする遺伝子断片としてESTファイル、Genbank accession number AV009191、ラットChM1Lをコードする遺伝子断片としてESTファイル、Genbank accession number AI112003が検出された。クローンテック社製Mouse 11-day Embryo Marathon-Ready™ cDNA及びRat Skeletal muscle Marathon-Ready™ cDNAを用いてヒトChM1L遺伝子の単離と同様にRACE法によりマウス及びラットChM1L遺伝子配列を決定した。

マウスChM1L cDNAの核酸塩基配列を配列番号３に、アミノ酸配列を配列番号4に示す。ラットChM1L cDNAの核酸塩基配列を配列番号５に、アミノ酸配列を配列番号６に示す。

マウス及びラットChM1L cDNAのcoding sequence (CDS) をPCRにより増幅、アガロース電気泳動後、精製し、pCR-Script™ Ampクローニングキット（Stratagene社）を用いて製品説明書に従ってクローニングした。マウス遺伝子のPCRに用いたプライマーの配列を配列番号９ (Forward primer) 及び配列番号１０ (Reverse primer) に、ラット遺伝子のPCRに使用したプライマーの配列を配列番号１１ (Forward primer) 及び配列番号１２ (Reverse primer) に示した。ベクターに組み込まれたChM1L遺伝子配列は製品説明書に従い、ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer (PE Applied Biosystems社) 及びABI PRISM™ BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kitを用いて決定した。

本実施例で作製した、ヒト、マウス及びラットChM1L遺伝子を組

み込んだベクターは、以下の略称を用いることとする。

・ヒトChM1L遺伝子を含むベクター：pCR-hChM1L

・マウスChM1L遺伝子を含むベクター：pCR-mChM1L

・ラットChM1L遺伝子を含むベクター：pCR-rChM1L

実施例３．C末端にヒスチジン６残基が融合したヒト及びマウスChM1Lタンパク質をコードする遺伝子を含むベクターの構築

ヒト及びマウスChM1L cDNAのcoding sequence（CDS）をPCRにより増幅、アガロース電気泳動後、精製し、C末端にヒスチジン６残基（Hisタグ）が融合するように改良したpCR-Script SK(+)ベクター（Stratagene社）及びpCR-Script™ Ampクローニングキット（Stratagene社）を用いて製品説明書に従ってクローニングした。ヒト遺伝子のPCRに用いたプライマーの配列を配列番号７（Forward primer）及び配列番号１３（Reverse primer）に、マウス遺伝子のPCRに使用したプライマーの配列を配列番号９（Forward primer）及び配列番号１４（Reverse primer）に示した。ChM1LのC末端にHisタグが融合したタンパク質をコードする塩基配列が組み込まれていることは、ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer（PE Applied Biosystems社）及びABI PRISM™ BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kitを製品説明書に従って使用し確認した。C末端にHisタグが融合したヒト及びマウスChM1Lのアミノ酸配列を配列番号１７及び１８に、それをコードする核酸塩基配列を配列番号１５及び１６に示した。

本実施例で作製したHisタグが融合したChM1Lタンパク質をコードする遺伝子をクローニングしたベクターは、以下の略称を用いることとする。

・ヒトChM1LとHisタグが融合したタンパク質をコードする遺伝子を含むベクター：pCR-hChM1LHis

・マウスChM1LとHisタグが融合したタンパク質をコードする遺伝子を含むベクター：pCR-mChM1LHis

実施例４．発現ベクターの構築

哺乳動物細胞でChM1L遺伝子を発現させることを目的として、pcDNA3.1(＋)ベクター（Invitrogen社）及びpCAGGSベクター（Gene, 108, 193-200, 1991）に、前記のpCR-hChM1L、pCR-mChM1L、pCR-hChM1LHis及びpCR-mChM1LHisベクターからCDSを制限酵素EcoRI及びNotIで切り出し、アガロース電気泳動後、目的のバンドを精製し、Ligation high（東洋紡）を製品説明書に従って使用してライゲーション反応を行った。ライゲーション反応後の溶液を、E.coli JM109 Competent cell（宝酒造）を用いて製品説明書に従ってトランスフォーメーションを行った。プラスミドを精製後、目的の遺伝子が組み込まれていることは制限酵素反応とアガロース電気泳動により確認した。

本実施例で作製したベクターは、以下の略称を用いることとする。

・hChM1L、mChM1L、hChM1LHis及びmChM1L遺伝子を含むpcDNA3.1(+)ベクター：

pcDNA-hChM1L、pcDNA-mChM1L、pcDNA-hChM1LHis及びpcDNA-mChM1LHis

・hChM1L、mChM1L、hChM1LHis及びmChM1L遺伝子を含むpCAGGSベクター：

pCAGGS-hChM1L、pCAGGS -mChM1L、pCAGGS-hChM1LHis及びpCAGGS-mChM1LHis

実施例５．FLAGタグが融合したヒト可溶性ChM1Lタンパク質を発現するベクターの構築

本実施例で述べるFLAGタグ（Sigma社）とは、8アミノ酸からなる

親水性のマーカーペプチド（Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys）であり、最後の５アミノ酸（Asp Asp Asp Asp Lys）は、エンテロキナーゼの認識配列となっている。本実施例によって作製されたベクターは、N末側から、プレプロトリプシンのシグナルシークエンス、FLAGタグ、ChM1Lの細胞外領域のC末端側が融合したタンパク質を発現させることが可能である。このベクターを用いて発現させたタンパク質は、後述する実施例９で詳述するように、プレプロトリプシンのシグナルシークエンスが切断を受けた後、可溶性タンパク質として培養液中に分泌される。また、このベクターにより発現されたタンパク質は、FLAGタグが融合しているため、抗FLAG抗体（Sigma社）を用いて精製することが可能であり、融合タンパク質をエンテロキナーゼで切断することにより、FLAGタグを除去することも可能である。

pCAGGSベクターに、N末端からプレプロトリプシンのシグナルシークエンスとFLAGタグ（配列番号２０）をコードする塩基配列（配列番号１９、Sigma社製　pFLAG-CMV-1ベクターに含まれる）を組み込んだベクターを構築した（以下、pSFベクターとする）。pSFベクターに配列番号２で表されるヒトChM1Lのアミノ酸番号212から317及び翻訳停止コドンを含む領域をコードする塩基配列（配列番号１の塩基配列番号684から1020）をPCR法により増幅し、この増幅産物をpSFベクターのFLAGタグをコードする塩基配列の3’側に組み込んだ。PCRに用いたプライマーの配列を配列番号２１（Forward primer）及び配列番号８（Reverse primer）に示した。構築したベクターに目的とする塩基配列が組み込まれていることは、ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer（PE Applied Biosystems社）及びABI PRISM™ BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kitを製品説明書に従って使用し確認した。本実施例で、ベクターに組み込

んだ核酸塩基配列を配列番号２２に、それがコードするアミノ酸配列を配列番号２３に示した。本実施例で作製したベクターは、pSF-shChM1Lという略称を用いることとする。

実施例６．ChM1L mRNAの発現解析

成体（10週齢）の各組織におけるChM1L mRNAの発現解析：図３(a)

10 週齢の C57BL/6 マウスを解剖して各組織を取り出し、直ちに液体窒素で凍結した。凍結した組織を細かく砕き、ISOGEN（ニッポンジーン社）を製品説明書に従って使用して、各組織の total RNA を得た。得られた各組織の total RNA 1ug をテンプレートとして、Superscript II preamprefication kit（GIBCO BRL 社）を製品説明書に従って使用して、cDNA 20uL を合成した。RT-PCR は反応系の総液量を 50uL とし、各組織の cDNA 0.5uL、ExTaq polymerase（宝酒造）を 0.25uL 使用して、Forward primer（配列番号９）及び reverse primer（配列番号１０）をそれぞれ 0.2uM となるように加えて、GeneAmp® PCR System 9700（PE Applied Biosystems 社）を用い、96℃ 30 秒、60℃ 30 秒、72℃ 1 分で 30 サイクル増幅させた。得られた反応液をエチジウムブロマイド入りの 1%アガロースゲルで電気泳動し、ゲルを紫外線照射下で撮影して、各組織における ChM1L mRNA の発現を検討した。

図３(a)に示したように、成体マウスの各組織におけるChM1L mRNAの発現は、脳、眼球、骨格筋、whole rib及び甲状腺で認められた。マウスにおけるChM-Iの発現は、眼球、胸腺、軟骨及びwhole ribで確認されている。従って、ChM1LとChM-Iは、生体内において異なる組織に発現していることが明らかとなり、その生理的な機能は異なることが示唆された。

胎児（妊娠17日目）の各組織におけるChM1L mRNAの発現解析：図3(b)

C57BL/6マウスの妊娠17日目の胎児を帝王切開により取り出し、各組織を取り出し直ちに液体窒素で凍結した。凍結した組織からのtotal RNAの抽出、cDNAの合成、RT-PCRの実施は上述の＜成体マウスの各組織におけるChM1L mRNAの発現解析＞と同様に実施した。

図3(b)に示すように、胎児の各組織におけるChM1L mRNAの発現は、眼球、腎臓、胃、whole rib及び気管で認められた。胎児マウスにおいては、成体マウスでは発現が認められなかった腎臓及び胃で発現が認められた。従って、ChM1Lはこれらの臓器の発生・形態形成に関与している可能性があり、臓器修復や再生にも関与すると考えられる。また、気管においてもChM1L mRNAが発現がしていることが明らかとなった。

胎児発生段階におけるChM1L mRNAの発現解析：図3(c)

C57BL/6マウスの妊娠10日目から出生日までの各日齢の胎児を帝王切開により取り出し、胎児を丸ごと液体窒素で凍結した。凍結した胎児からのtotal RNAの抽出、cDNAの合成、RT-PCRの実施は上述の＜成体マウスの各組織におけるChM1L mRNAの発現解析＞と同様に実施した。

ChM-I mRNAの解析は、Forward primer（配列番号２３）及びreverse primer（配列番号２４）を使用して、同条件で実施した。

図3(c)に示すように、胎児発生段階におけるChM1L mRNAの発現は、妊娠１０日目では非常に弱く、１１日目から１３日目にかけて発現が上昇している。一方、ChM-Iの発現もChM1Lと同様の発現上昇を示すが、妊娠１０日目及び１１日目では明らかに、ChM1Lよりも強い発現を示した。従って、胎児発生段階においては、ChM1LはCh

M-Iよりも遅れて発現が上昇することが明らかとなり、両分子が胎児発生において異なる機能を有することが明らかとなった。

実施例７．抗ChM1Lペプチドポリクローナル抗体の作製

ヒトChM1Lの配列番号２に示した２４５～２５２残基までの配列のC末端にシステインを有するペプチドを化学合成した。この合成ペプチドにMBS/KLH（m-maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester/keyhole limpet hemocyanin、ベーリンガーマンハイム社）をカップリングさせた。この複合体を生理食塩液に溶解させた後、等量のFCA（フロイント完全アジュバント）を加え、超音波処理してエマルジョンを調製した。このエマルジョンをウサギの皮下に投与し、初回免疫とした。初回免疫から４週間後にFIA（フロイント不完全アジュバント）を用いて大腿筋に追加免疫を行い、その後は約２週間又は約４週間の間隔で皮下投与により４回免疫を行った。追加免疫の間に耳介から部分採血、最終免疫後は全採血を行い血清を分離し、ペプチドカラムによるアフィニティー精製を実施して抗ChM1Lペプチドポリクローナル抗体を得た。

実施例８．ヒト及びマウスChM1Lリコンビナントタンパク質のwestern blot法による解析：図４

リポフェクトアミン試薬（GIBCO BRL社）を用いて、製品説明書に従い、pCAGGS、pCAGGS-hChM1L及びpCAGGS-mChM1L（図４(a)及び(c)）あるいは、pCAGGS、pCAGGS-hChM1LHis及びpCAGGS-mChM1LHis（図４(b)及び(d)）をCOS7細胞にトランスフェクトした。トランスフェクションしてから約48時間後に、培養上清及び細胞成分を12.5%ゲルでSDS-PAGE（sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis）を行った後、ニトロセルロース膜にトランスファーした。一次抗体反応及び二次抗体反応を行い、ECLplus試薬（アマシャムファルマシアバイオテク社）を用いて製品説明書に従い、

発色反応を行った。pCAGGS、pCAGGS-hChM1L及びpCAGGS-mChM1Lをトランスフェクトした場合のWestern blotは、一次抗体に前述の実施例で述べた抗ChM1Lポリクローナル抗体、二次抗体にhorseradish peroxdase（HRP）で標識された抗ウサギIgG抗体（Dako社）を、pCAGGS、pCAGGS-hChM1LHis及びpCAGGS-mChM1LHisをトランスフェクトした場合のWestern blotには一次抗体に抗Hisタグ抗体（Invitrogen社）、二次抗体にHRPで標識された抗マウスIgG抗体（アマシャムファルマシアバイオテク社）を用いて実施した。

Western blotと同じサンプルでSDS-PAGEを実施し、クーマシーブリリアントブルー（CBB)で染色した結果を図４（ａ）及び（ｂ）に示した。

Western blotの結果、すべての培養上清でChM1Lのバンドは確認されなかった。細胞成分では、図４(b)及び(d)に示したようにリコンビナントChM1Lタンパク質は、抗ChM1Lペプチド抗体及び抗Hisタグ抗体のいずれを使用しても、40kDa付近に２本のバンドとして検出された。後述の実施例で詳しく述べるが、糖鎖構造の解析により、高分子量側のバンドはN結合型の糖鎖が結合したフォームであることが確認された。

実施例９．可溶性ヒトChM1Lリコンビナントタンパク質のwestern blot法による解析：図５

リポフェクトアミン試薬（GIBCO BRL社）を用いて、製品説明書に従い、pCAGGS及びpSF-shChM1LをCOS7細胞にトランスフェクトした。培養上清を12.5%ゲルでSDS-PAGEを行った後、ニトロセルロース膜にトランスファーした。一次抗体には抗FLAG M2抗体（Sigma社）を、二次抗体にはHRPで標識された抗マウスIgG抗体（アマシャムファルマシアバイオテク社）を使用し、ECLplus試薬（アマシャムファルマシアバイオテク社）を用いて製品説明書に従い、発色反応

を行った。

図５に示すように、可溶性ヒトChM1Lタンパク質は17-18kDa付近に１本のバンドとして検出された。

実施例１０．ChM1Lリコンビナントタンパク質の糖鎖構造解析

リポフェクトアミン試薬（GIBCO BRL社）を用いて、製品説明書に従い、pCAGGS-mChM1LHisをCOS7細胞にトランスフェクトした。ディッシュに2%SDSを含むPBSを加え、スクレイパーで細胞を回収し、この懸濁液を95℃で60分間加熱した後、その上清をSDS-OUT™ SDS Precipitation kit（Pierce社）を用いて処理してSDSを除いた。このようにして得られたタンパク質溶液を用いて、Enzymatic Deglycosylation Kit（BIO RAD社）を用いて製品説明書に従って、NANase II、O-Glycosidase DS及びPNGase Fで上記のタンパク質溶液を処理して、糖鎖消化反応を実施した。この反応液を12.5%ゲルでSDS-PAGEを行った後、ニトロセルロース膜にトランスファーした。一次抗体には抗Hisタグ抗体（Invitrogen社）を、二次抗体にはHRPで標識された抗マウスIgG抗体（アマシャムファルマシアバイオテク社）を使用し、ECLplus試薬（アマシャムファルマシアバイオテク社）を用いて製品説明書に従い、発色反応を行った。

図６に示したように、ChM1Lタンパク質の高分子量側のバンドは、PNGase Fで処理した場合（レーン２及び５）にのみ消失した。従って、ChM1LタンパクはN結合型の糖鎖で修飾されていることが明らかとなった。

実施例１１．肋軟骨におけるChM1Lタンパク質の免疫染色法による解析

約10週齢のC57BL/6マウスを解剖して、whole ribを取り出し、4%パラホルムアルデヒドを含む10mMリン酸緩衝バッファー、pH7.4（PBS）中で固定し、パラフィンで包埋した後、切片を作成した。免疫

染色の各工程は、ヒストファインSAB-PO(R)キット（ニチレイ）を用いて製品説明書に従って実施したが、概略は以下のとおりである。脱パラフィン処理の後、3%過酸化水素水で内因性ペルオキシダーゼを消化した。PBSで洗浄し、10%正常ヤギ血清でブロッキングした後、前述の抗ChM1Lペプチド抗体を1/160希釈で加え、4℃で一晩インキュベートした。ネガティブコントロールとしてはウサギIgGを使用した。ビオチン標識抗ウサギIgG抗体及びペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを反応させた後、3,3-ジアミノベンチジン・4HClを加えて発色反応を行った。核をヘマトキシリンで染色、封入後、観察を実施した。

図７に示すように、ChM1Lタンパク質は肋軟骨組織において軟骨細胞周囲に存在する扁平な線維芽細胞様の形態を示す細胞に発現していることが明らかになった。一方、ChM-Iが発現していると報告されている軟骨細胞では発現が認められなかった。

実施例１２．ヒトChM1L遺伝子の染色体マッピング

日本DNAデータバンク（DDBJ：DNA data bank of Japan）から、ヒトChM1L遺伝子配列（配列番号１）を用いて、DDBJ全データを対象にしてBLASTNサーチを実施した。その結果、ChM1L遺伝子のゲノム配列としてGenbank accession No.AL035608を検出した。AL035608は、ヒトX染色体にマッピングされている配列である。従って、ヒトChM1L遺伝子は、X染色体上に存在することが明らかとなった。

実施例１３．可溶性ヒトChM1Lリコンビナントタンパク質の精製

リポフェクトアミン試薬（GIBCO BRL社）を用いて製品説明書に従って、pSF-shChM1LをCOS7細胞にトランスフェクトし、約４８時間後に培養上清を回収した。抗FLAG M2アフィニティーゲル（Sigma社）を用いて、アフィニティーカラムを作製し、培養上清をカラムにアプライした。25mM Tris-HCl, 150mM NaCl (pH7.4)でカラムを

３回洗浄後、0.1Mグリシン－HCl（pH3.5)を用いて溶出し、1/20容量の1M Tris-HCl（pH9.5)を用いて溶出液を中和した。

培養上清及び溶出液を用いてSDS-PAGEを行い、クーマシーブリリアントブルー（CBB)染色を実施した結果を図８に示した。培養上清中には多種のタンパク質が存在するが（図８、レーン１）、溶出液中では可溶性ヒトChM1Lタンパク質が約20kDaのバンドとして確認され、上記操作によって可溶性ヒトChM1Lタンパク質が濃縮、精製されたことが明らかになった（図８、レーン２）。

実施例１４．ヒト臍帯静脈内皮細胞を用いた血管新生阻害作用の検討

ヒト臍帯静脈内皮細胞（Human Umbilical Vein Endothelial Cells:HUVECs、Clonetics社）は、内皮細胞専用培地（EGM®-2 Bullet Kit®、Clonetics社）で培養した。１２ウェルプレートに、Growth factor reduced Matrigel（BECTON DICKINSON社）を600uL/ウェルで加えて、３７℃で３０分間インキュベートした。ヘパリンを含まない内皮細胞専用培地を内皮細胞基本培地（EBM®-2、Clonetics社）で1/8に希釈した培地を用いて、5×10^4 cells/mLのHUVECsを含む細胞懸濁液を調製した。

各被験物質溶液は、0.1Mグリシン-HCl（pH3.5)に1/20容量の1M Tris-HCl（pH9.5)を加えた溶液で調製し、200uL/ウェルの容量で処理を行った。陰性対象として上記のバッファー及びBSA（bovin serum albumin)を20ug/ウェルで、陽性対象物質としてPletelet factor 4（PF-4、CHEMICON社）を１及び10ug/ウェルで、可溶性ヒトChM1Lリコンビナントタンパク質は実施例１３の溶出画分を10及び20ug/ウェルで処理した。細胞懸濁液2mL（1×10^5 cells)と各被験物質溶液200uLを混合して、Growth factor reduced Matrigelでコートした12ウェルプレートにシーディングし、９時間後に管腔様構造の形

成を観察して写真を撮影した。その結果を図９に示した。陰性対象ではHUVECsが管腔様構造を形成しているが（図９（ａ）及び（ｂ））、ChM1Lを20ug/ウェルで処理した場合には（図９（ｄ））、陰性対象と比較して管腔様構造の形成が阻害された。

従って、ChM1Lは血管新生阻害作用を有することが明らかとなり、可溶性のChM1Lポリペプチドは糖尿病性網膜症、癌、慢性関節リウマチなどの血管新生を伴う疾患の治療薬として適用できることが明らかとなった。

請　求　の　範　囲

1．配列番号2で表されるアミノ酸配列を実質的に含むポリペプチドをコードするヒト遺伝子。

2．配列番号4で表されるアミノ酸配列を実質的に含むポリペプチドをコードするマウス遺伝子。

3．配列番号6で表されるアミノ酸配列を実質的に含むポリペプチドをコードするラット遺伝子。

4．配列番号1で表される塩基配列を有する請求項1に記載のヒト遺伝子。

5．配列番号3で表される塩基配列を有する請求項2に記載のマウス遺伝子。

6．配列番号5で表される塩基配列を有する請求項3に記載のラット遺伝子。

7．配列番号2で表されるアミノ酸配列を実質的に含む、ヒト遺伝子がコードするポリペプチド。

8．配列番号4で表されるアミノ酸配列を実質的に含む、マウス遺伝子がコードするポリペプチド。

9．配列番号6で表されるアミノ酸配列を実質的に含む、ラット遺伝子がコードするポリペプチド。

10．請求項1～6のいずれか一項に記載の遺伝子の少なくとも一部とハイブリダイズするオリゴヌクレオチドプローブ。

11．請求項1～6のいずれか一項に記載の遺伝子を含む組換え体DNA。

12．請求項11に記載の組換え体DNAによって形質転換された形質転換体。

13．請求項12に記載の形質転換体を培養し、得られる培養物か

らヒト、マウス及びラット遺伝子がコードするポリペプチドを採取することを特徴とする前記ポリペプチドの製造方法。

14．請求項７～９のいずれか一項に記載のポリペプチドと特異的に反応するモノクローナル抗体。

15．請求項７～９のいずれか一項に記載のポリペプチドと特異的に反応するポリクローナル抗体。

16．請求項７～９のいずれか一項に記載のポリペプチドで免疫された抗体産生細胞とミエローマ細胞とを融合させることにより得られる、請求項１４に記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

17．請求項１０に記載のオリゴヌクレオチドプローブを含む遺伝子の検出試薬。

18．請求項７～９のいずれか一項に記載のポリペプチド、並びに請求項１４に記載のモノクローナル抗体及び/又は請求項１５に記載のポリクローナル抗体を含む診断用キット。

19．請求項７～９のいずれか一項に記載のポリペプチドからなる医薬組成物。

20．請求項１４に記載のモノクローナル抗体又は請求項１５に記載のポリクローナル抗体からなる医薬組成物。

21．請求項１～６に記載の遺伝子の一部と特異的にハイブリダイズするアンチセンスオリゴヌクレオチドからなる医薬組成物。

22．請求項１～６に記載の遺伝子の少なくとも一部を含む、遺伝子治療に利用しうる核酸からなる医薬組成物。

23．請求項１あるいは４に記載のX染色体上に存在することを特徴とするヒト遺伝子。

24．請求項７～９に記載のポリペプチドが細胞膜結合型であることを特徴とするポリペプチド。

25. 請求項２４に記載の細胞膜結合型ポリペプチドをコードする遺伝子。

26. 請求項７～９に記載のポリペプチドが血管新生阻害作用を有することを特徴とするポリペプチド。

27. 請求項２６に記載の血管新生阻害作用を有するポリペプチドをコードする遺伝子。

Fig.1A

hChM-I : human ChM-I
hChM1L : human ChM1L

```
hChM-I          MTENSDKVPIALVGPDDVEFCSPPAYATLTVKPSSPARLLKVGAVVLISGAVLLLFGAIG
hChM1L          ---------MAKNPPENCEDCHILNAEAFKSKK--ICKSLKICGLVFGILALTLIVLFWG
                          *   *   * *         *       **    *    * *     *

hChM-I          AFYFWKGSDSHIYNVHYTMSINGKLQDGSMEIDAGNNLETFKMGSGAEEAIAVNDFQNGI
hChM1L          SKHFWPEVPKKAYDMEHTFYSNGEKKKIYMEIDPVTRTEIFRSGNGTDETLEVHDFKNGY
                   **       *    *   **      ****     * *  * *  *   * ** **

hChM-I          TGIRFAGGEKCYIKAQVKARIPEVGAVTKQSISSKLEGKIMPVKYEENSLIWVAVDQPVK
hChM1L          TGIYFVGLQKCFIKTQIKV-IPEFSEPEEEID----ENEEITTTFFEQSVIWVPAEKPIE
                *** * *  ** ** * *  ***             *         * * ***    *

hChM-I          DNSFLS-SKVLELCGDLPIFWLKPTYP--KEIQRERREVVRKIVPTTTKRPHSGPRSNPG
hChM1L          NRDFLKNSKILEICDNVTMYWINPTLISVSELQDFEEEGEDLHFPANEKKGIEQNEQWVV
                   **  ** ** *      *  **     * *    *      *   *

hChM-I          AGRLNNETRPSVQEDSQAFNPDNPYHQQEGESMTFDPRLDHEGICCIECRRSYTHCQKIC
hChM1L          PQVKVEKTRHAR----QASEEELPINDYTENGIEFDPMLDERGYCCIYCRRGNRYCRRVC
                       **       **     *          *** **  * *** ***    *   *

hChM-I          EPLGGYYPWPYNYQGCRSACRVIMPCSWWVARILGMV
hChM1L          EPLLGYYPYPYCYQGGRVICRVIMPCNWWVARMLGRV
                *** **** ** *** *  ******* ***** ** *
```

Fig.1B

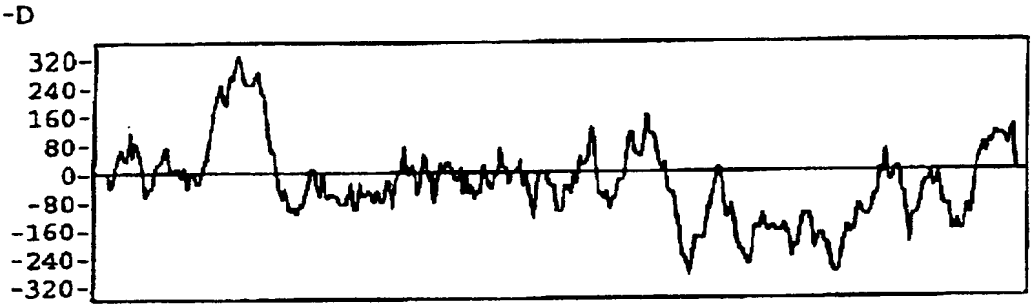
hChM1L : human ChM1L
mChM1L : mouse ChM1L
rChM1L : rat ChM1L

```
mChM1L      MAKNPPENCEGCHILNAEALKSKKICKSLKICGLVFGILALTLIVLFWGSKHFWPEVSKK
rChM1L      MAKNPPENCEGCHILNAEALKSKKIRKSLKICGLVFGILALTLIVLFWGSKHFWPEVSKK
hChM1L      MAKNPPENCEDCHILNAEAFKSKKICKSLKICGLVFGILALTLIVLFWGSKHFWPEVPKK
            ********** ******** ***** ******************************** **

mChM1L      TYDMEHTFYSNGEKKKIYMEIDPITRTEIFRSGNGTDETLEVHDFKNGYTGIYFVGLQKC
rChM1L      TYGMEHTFYSNGEKKKISMEIDPITRTEIFRSGNGTDETLEVHDFKNGYTGIYFVGLQKC
hChM1L      AYDMEHTFYSNGEKKKIYMEIDPVTRTEIFRSGNGTDETLEVHDFKNGYTGIYFVGLQKC
             * ************** ***** **********************************

mChM1L      FIKTQIKVIPEFSEPEEEIDENEEITTTFFEQSVIWVPAEKPIENRDFLKNSKILEICDN
rChM1L      FIKTQIKVIPEFSEPEEEIDENEEITTTFFEQSVIWVPAEKPIENRDFLKNSKILEICDN
hChM1L      FIKTQIKVIPEFSEPEEEIDENEEITTTFFEQSVIWVPAEKPIENRDFLKNSKILEICDN
            ************************************************************

mChM1L      VTMYWINPTLIAVSELQDFEEDGEDLHFPTSEKKGIDQNEQWVVPQVKVEKTRHTRQASE
rChM1L      VTMYWINPTLIAVSELQDFEEDGEDLHFPTSEKKGIDQNEQWVVPQVKVEKTRRTRQASE
hChM1L      VTMYWINPTLISVSELQDFEEEGEDLHFPANEKKGIEQNEQWVVPQVKVEKTRHARQASE
            *********** ********* *******  ***** ***************  *****

mChM1L      EDLPINDYTENGIEFDPMLDERGYCCIYCRRGNRYCRRVCEPLLGYYPYPYCYQGGRVIC
rChM1L      EDLPVNDYTENGIEFDPMLDERGYCCIYCRRGNRYCRRVCEPLLGYYPYPYCYQGGRVIC
hChM1L      EELPINDYTENGIEFDPMLDERGYCCIYCRRGNRYCRRVCEPLLGYYPYPYCYQGGRVIC
            * ** ************************************************************

mChM1L      RVIMPCNWWVARMLGRV
rChM1L      RVIMPCNWWVARMLGRV
hChM1L      RVIMPCNWWVARMLGRV
            *****************
```

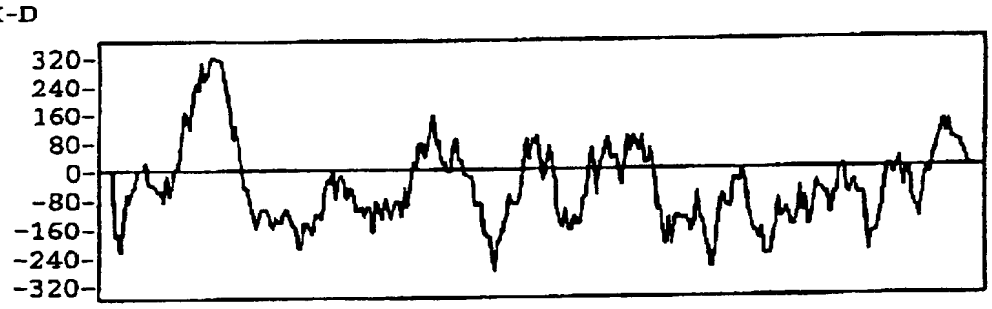
Fig. 2

(a) hChM-I : human ChM-I
(b) hChM1L : human ChM1L
(c) mChM1L : mouse ChM1L

(a) hChM-I



(b) hChM1L



(c) mChM1L

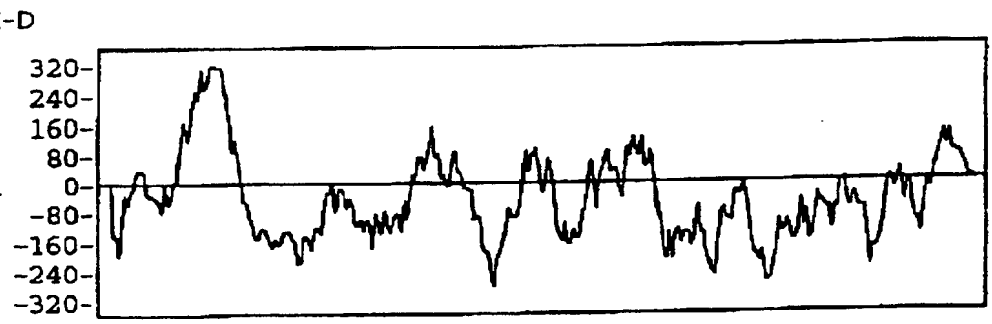


Fig.3

(a) 成体（10週齢）の各組織における発現
1. 脳、2. 眼球、3. 肺、4. 胸腺、5. 心臓、6. 肝臓、7. 腎臓、8. 胃、9. 脾臓、
10. 骨格筋、11. whole rib、12. 脂肪、13. 副腎、14. 下垂体、15. 甲状腺、16. 腸管
(b) 胎児（妊娠17日目）の各組織における発現
1. 脳、2. 眼球、3. 肺、4. 胸腺、5. 心臓、6. 肝臓、7. 腎臓、8. 脾臓、9. 胃、
10. 腸管、11. whole rib、12.気管、13. 膵臓
(c) 胎児発生段階における発現
1. 妊娠10日、2. 妊娠11日、3. 妊娠12日、4. 妊娠13日、5. 妊娠14日、
6. 妊娠15日、7. 妊娠16日、8. 妊娠17日、9. 妊娠18日、10. 出生日

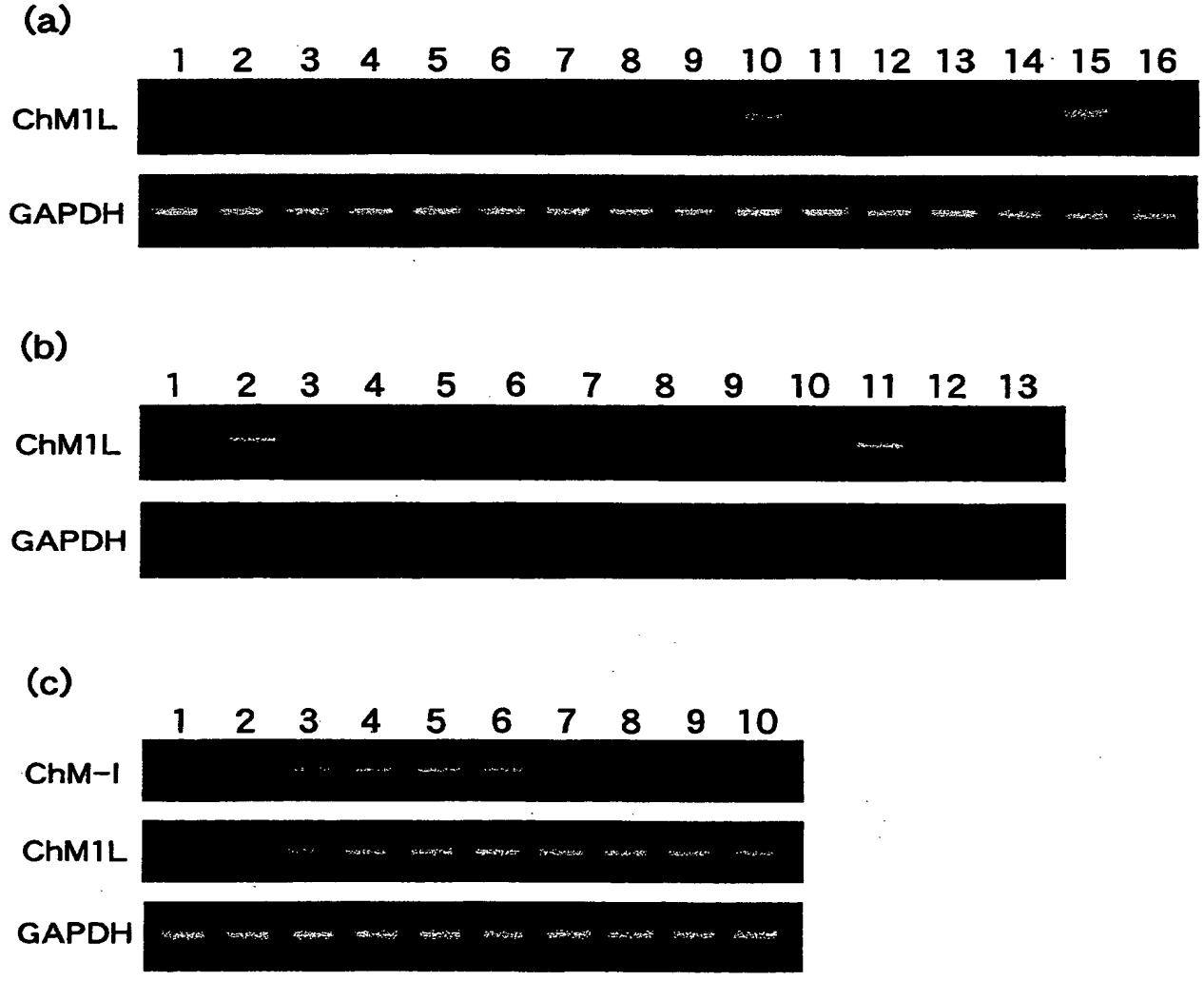


Fig. 4

(a) SDS-PAGE：1. Mock、2. human ChM1L、3. mouse ChM1L

(b) SDS-PAGE：1. Mock、2. human ChM1L(His)、3. mouse ChM1L(His)

(c) Western blot（抗ペプチド抗体による検出）：
1. Mock、2. human ChM1L、3. mouse ChM1L

(d) Western blot（抗Hisタグ抗体による検出）：
1. Mock、2. human ChM1L(His)、3. mouse ChM1L(His)

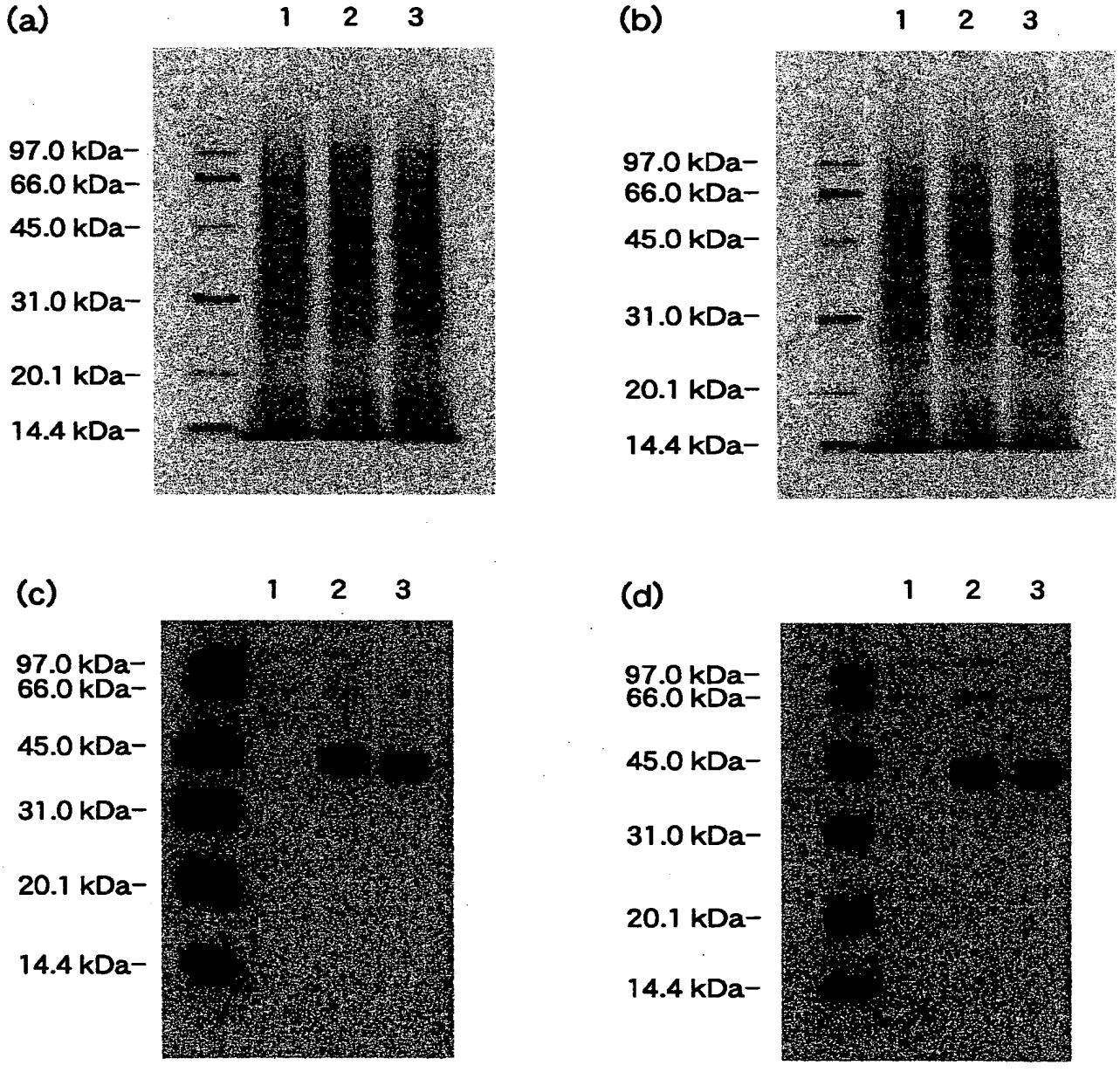


Fig.5

1. Mock
2. soluble human ChM1L

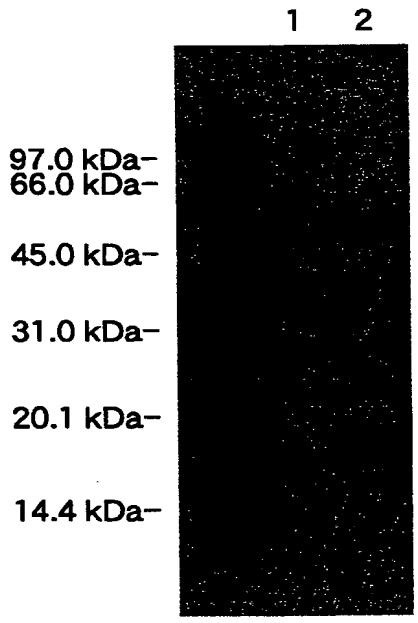


Fig.6

1. 未処理、2. NANase II + O-Glycosidase DS + PNGase F処理、
3. NANase II処理、4. O-Glycosidase DS処理、5. PNGase F処理

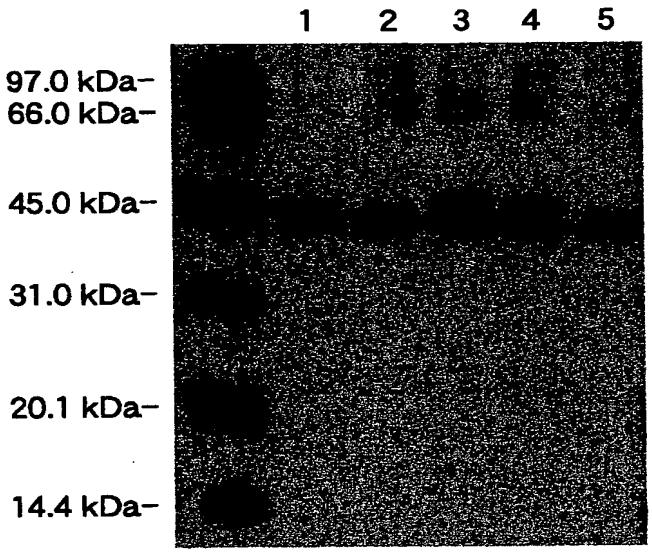
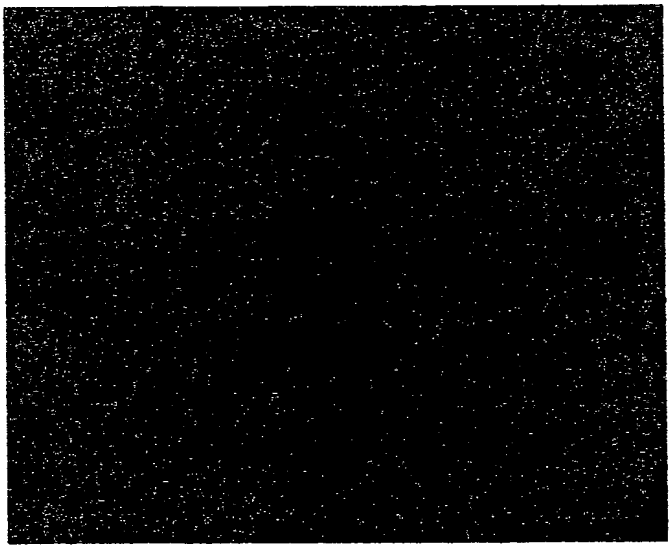


Fig.7

(a) ウサギIgG



(b) 抗ChM1Lペプチド抗体

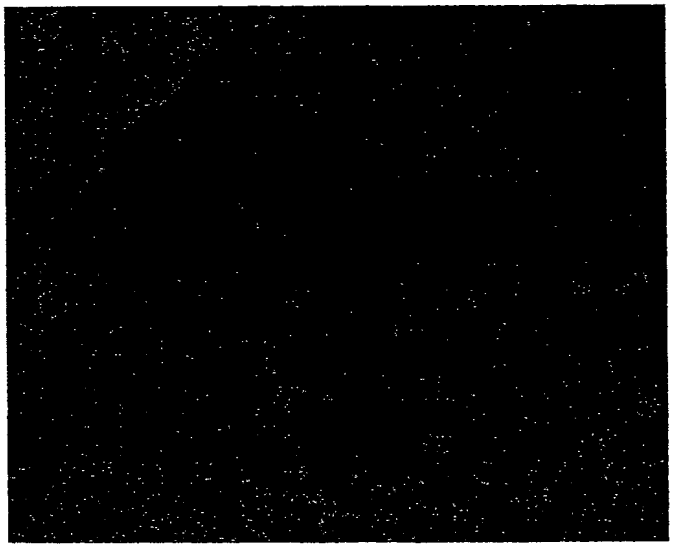


Fig. 8

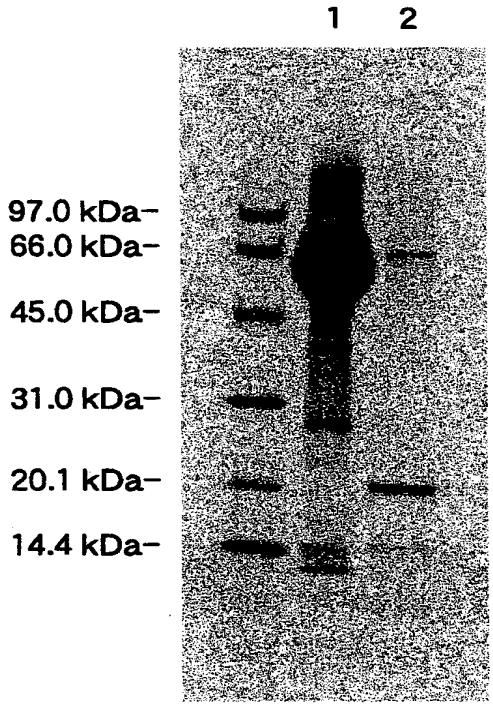
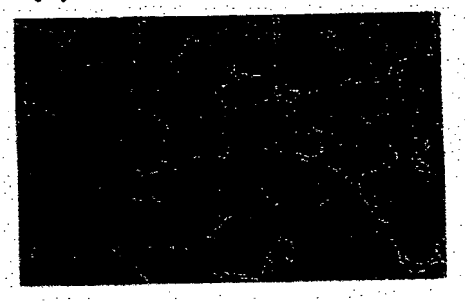
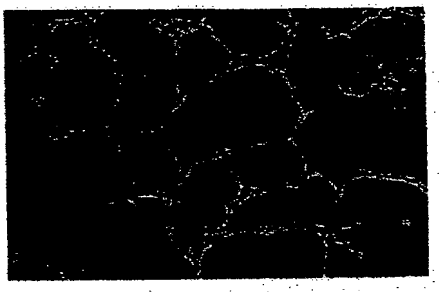


Fig. 9

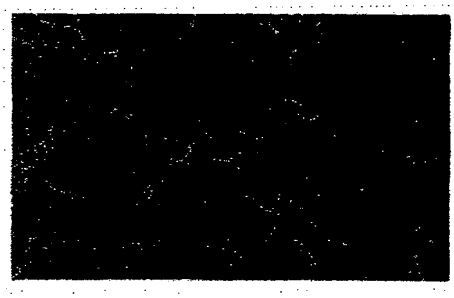
(a) Buffer control



(b) BSA (20ug/well)

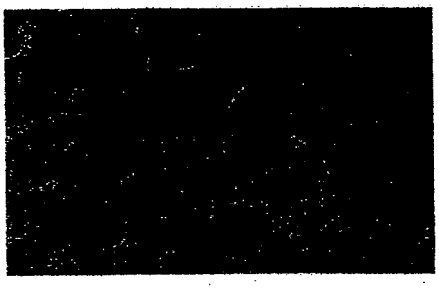


(c) shChM1L (10ug/well)

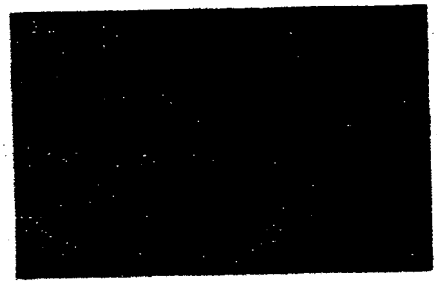


(d) shChM1L (20ug/well)

(e) PF-4 (1ug/well)



(f) PF-4 (10ug/well)



SEQUENCE LISTING

<110> TEIJIN LIMITED

<120> A novel polypeptide and its encoding gene

<130> PCT

<140>

<141>

<160> 25

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1200

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (67)..(1020)

<400> 1

ctccacctca gcaggtgtct ctcagtcctc tcaaagcaag gaaagagtac tgtgtgctga 60

gagacc atg gca aag aat cct cca gag aat tgt gaa gac tgt cac att 108

Met Ala Lys Asn Pro Pro Glu Asn Cys Glu Asp Cys His Ile

1 5 10

cta aat gca gaa gct ttt aaa tcc aag aaa ata tgt aaa tca ctt aag 156

Leu Asn Ala Glu Ala Phe Lys Ser Lys Lys Ile Cys Lys Ser Leu Lys

15 20 25 30

att tgt gga ctg gtg ttt ggt atc ctg gcc cta act cta att gtc ctg 204

Ile Cys Gly Leu Val Phe Gly Ile Leu Ala Leu Thr Leu Ile Val Leu

35 40 45

ttt tgg ggg agc aag cac ttc tgg ccg gag gta ccc aaa aaa gcc tat 252
Phe Trp Gly Ser Lys His Phe Trp Pro Glu Val Pro Lys Lys Ala Tyr
50 55 60

gac atg gag cac act ttc tac agc aat gga gag aag aag aag att tac 300
Asp Met Glu His Thr Phe Tyr Ser Asn Gly Glu Lys Lys Lys Ile Tyr
65 70 75

atg gaa att gat cct gtg acc aga act gaa ata ttc aga agc gga aat 348
Met Glu Ile Asp Pro Val Thr Arg Thr Glu Ile Phe Arg Ser Gly Asn
80 85 90

ggc act gat gaa aca ttg gaa gta cac gac ttt aaa aac gga tac act 396
Gly Thr Asp Glu Thr Leu Glu Val His Asp Phe Lys Asn Gly Tyr Thr
95 100 105 110

ggc atc tac ttc gtg ggt ctt caa aaa tgt ttt atc aaa act cag att 444
Gly Ile Tyr Phe Val Gly Leu Gln Lys Cys Phe Ile Lys Thr Gln Ile
115 120 125

aaa gtg att cct gaa ttt tct gaa cca gaa gag gaa ata gat gag aat 492
Lys Val Ile Pro Glu Phe Ser Glu Pro Glu Glu Glu Ile Asp Glu Asn
130 135 140

gaa gaa att acc aca act ttc ttt gaa cag tca gtg att tgg gtc cca 540
Glu Glu Ile Thr Thr Thr Phe Phe Glu Gln Ser Val Ile Trp Val Pro
145 150 155

gca gaa aag cct att gaa aac cga gat ttt ctt aaa aat tcc aaa att 588
Ala Glu Lys Pro Ile Glu Asn Arg Asp Phe Leu Lys Asn Ser Lys Ile
160 165 170

ctg gag att tgt gat aac gtg acc atg tat tgg atc aat ccc act cta 636
Leu Glu Ile Cys Asp Asn Val Thr Met Tyr Trp Ile Asn Pro Thr Leu
175 180 185 190

ata tca gtt tct gag tta caa gac ttt gag gag gag gga gaa gat ctt 684
Ile Ser Val Ser Glu Leu Gln Asp Phe Glu Glu Glu Gly Glu Asp Leu
195 200 205

cac ttt cct gcc aac gaa aaa aaa ggg att gaa caa aat gaa cag tgg 732
His Phe Pro Ala Asn Glu Lys Lys Gly Ile Glu Gln Asn Glu Gln Trp
210 215 220

gtg gtc cct caa gtg aaa gta gag aag acc cgt cac gcc aga caa gca 780
Val Val Pro Gln Val Lys Val Glu Lys Thr Arg His Ala Arg Gln Ala
225 230 235

agt gag gaa gaa ctt cca ata aat gac tat act gaa aat gga ata gaa 828
Ser Glu Glu Glu Leu Pro Ile Asn Asp Tyr Thr Glu Asn Gly Ile Glu
240 245 250

ttt gat ccc atg ctg gat gag aga ggt tat tgt tgt att tac tgc cgt 876
Phe Asp Pro Met Leu Asp Glu Arg Gly Tyr Cys Cys Ile Tyr Cys Arg
255 260 265 270

cga ggc aac cgc tat tgc cgc cgc gtc tgt gaa cct tta cta ggc tac 924
Arg Gly Asn Arg Tyr Cys Arg Arg Val Cys Glu Pro Leu Leu Gly Tyr
275 280 285

tac cca tat cca tac tgc tac caa gga gga cga gtc atc tgt cgt gtc 972
Tyr Pro Tyr Pro Tyr Cys Tyr Gln Gly Gly Arg Val Ile Cys Arg Val
290 295 300

atc atg cct tgt aac tgg tgg gtg gcc cgc atg ctg ggg agg gtc taa 1020
Ile Met Pro Cys Asn Trp Trp Val Ala Arg Met Leu Gly Arg Val
305 310 315

taggaggttt gagctcaaat gcttaaactg ctggcaacat ataataaatg catgctattc 1080

aatgaatttc tgcctatgag gcatctggcc cctggtagcc agctctccag aattacttgt 1140

aggtaattcc tctcttcatg ttctaataaa cttctacatt atcaccaaaa aaaaaaaaaa 1200

<210> 2

<211> 317

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ala Lys Asn Pro Pro Glu Asn Cys Glu Asp Cys His Ile Leu Asn
1 5 10 15

Ala Glu Ala Phe Lys Ser Lys Lys Ile Cys Lys Ser Leu Lys Ile Cys
20 25 30

Gly Leu Val Phe Gly Ile Leu Ala Leu Thr Leu Ile Val Leu Phe Trp
35 40 45

Gly Ser Lys His Phe Trp Pro Glu Val Pro Lys Lys Ala Tyr Asp Met
50 55 60

Glu His Thr Phe Tyr Ser Asn Gly Glu Lys Lys Lys Ile Tyr Met Glu
65 70 75 80

Ile Asp Pro Val Thr Arg Thr Glu Ile Phe Arg Ser Gly Asn Gly Thr
85 90 95

Asp Glu Thr Leu Glu Val His Asp Phe Lys Asn Gly Tyr Thr Gly Ile
100 105 110

Tyr Phe Val Gly Leu Gln Lys Cys Phe Ile Lys Thr Gln Ile Lys Val
115 120 125

Ile Pro Glu Phe Ser Glu Pro Glu Glu Glu Ile Asp Glu Asn Glu Glu
130 135 140

Ile Thr Thr Thr Phe Phe Glu Gln Ser Val Ile Trp Val Pro Ala Glu
145 150 155 160

Lys Pro Ile Glu Asn Arg Asp Phe Leu Lys Asn Ser Lys Ile Leu Glu
165 170 175

Ile Cys Asp Asn Val Thr Met Tyr Trp Ile Asn Pro Thr Leu Ile Ser
180 185 190

Val Ser Glu Leu Gln Asp Phe Glu Glu Glu Gly Glu Asp Leu His Phe
195 200 205

Pro Ala Asn Glu Lys Lys Gly Ile Glu Gln Asn Glu Gln Trp Val Val
210 215 220

Pro Gln Val Lys Val Glu Lys Thr Arg His Ala Arg Gln Ala Ser Glu
225 230 235 240

Glu Glu Leu Pro Ile Asn Asp Tyr Thr Glu Asn Gly Ile Glu Phe Asp
245 250 255

Pro Met Leu Asp Glu Arg Gly Tyr Cys Cys Ile Tyr Cys Arg Arg Gly
260 265 270

Asn Arg Tyr Cys Arg Arg Val Cys Glu Pro Leu Leu Gly Tyr Tyr Pro
275 280 285

Tyr Pro Tyr Cys Tyr Gln Gly Gly Arg Val Ile Cys Arg Val Ile Met
290 295 300

Pro Cys Asn Trp Trp Val Ala Arg Met Leu Gly Arg Val
305 310 315

<210> 3

<211> 1180

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (59)..(1012)

<400> 3

agcagtagtc ctctcagtcc tctcaaagca gggaaagagc accgtgtgct gggagacc 58

atg gca aag aat cct cca gag aac tgt gag ggc tgt cac att cta aat 106
Met Ala Lys Asn Pro Pro Glu Asn Cys Glu Gly Cys His Ile Leu Asn
1 5 10 15

gca gaa gct ctg aaa tct aag aag ata tgt aaa tca ctg aag att tgt 154
Ala Glu Ala Leu Lys Ser Lys Lys Ile Cys Lys Ser Leu Lys Ile Cys
20 25 30

gga cta gtg ttt ggt atc ctg gcc tta act cta att gtc ctg ttt tgg 202
Gly Leu Val Phe Gly Ile Leu Ala Leu Thr Leu Ile Val Leu Phe Trp
35 40 45

ggg agc aaa cac ttc tgg ccc gag gta tcc aag aaa acc tat gac atg 250
Gly Ser Lys His Phe Trp Pro Glu Val Ser Lys Lys Thr Tyr Asp Met
50 55 60

gag cac act ttc tac agc aac ggc gag aag aag aag att tac atg gaa 298
Glu His Thr Phe Tyr Ser Asn Gly Glu Lys Lys Lys Ile Tyr Met Glu
65 70 75 80

att gat ccc ata acc aga aca gaa ata ttc aga agt gga aat ggc act 346
Ile Asp Pro Ile Thr Arg Thr Glu Ile Phe Arg Ser Gly Asn Gly Thr
85 90 95

gat gaa aca ttg gaa gtc cat gac ttt aaa aat gga tac act ggc atc 394
Asp Glu Thr Leu Glu Val His Asp Phe Lys Asn Gly Tyr Thr Gly Ile
100 105 110

tac ttt gta ggt ctt caa aaa tgc ttt att aaa act caa atc aaa gtg 442
Tyr Phe Val Gly Leu Gln Lys Cys Phe Ile Lys Thr Gln Ile Lys Val
115 120 125

att cct gaa ttt tct gaa cca gag gaa gaa ata gat gag aat gaa gaa 490
Ile Pro Glu Phe Ser Glu Pro Glu Glu Glu Ile Asp Glu Asn Glu Glu
130 135 140

att act aca act ttc ttt gaa cag tca gtg att tgg gtt ccc gca gaa 538
Ile Thr Thr Thr Phe Phe Glu Gln Ser Val Ile Trp Val Pro Ala Glu
145 150 155 160

aag cct att gaa aac aga gac ttc ctg aaa aat tct aaa att ctg gag 586
Lys Pro Ile Glu Asn Arg Asp Phe Leu Lys Asn Ser Lys Ile Leu Glu
165 170 175

att tgc gat aat gtg acc atg tac tgg atc aat ccc act cta ata gca 634
Ile Cys Asp Asn Val Thr Met Tyr Trp Ile Asn Pro Thr Leu Ile Ala
180 185 190

gtt tca gaa tta cag gac ttt gag gag gac ggt gaa gat ctt cac ttt 682
Val Ser Glu Leu Gln Asp Phe Glu Glu Asp Gly Glu Asp Leu His Phe
195 200 205

cct acc agt gaa aaa aag ggg att gac cag aat gag caa tgg gtg gtc 730
Pro Thr Ser Glu Lys Lys Gly Ile Asp Gln Asn Glu Gln Trp Val Val
210 215 220

ccg caa gtg aag gtg gag aag acc cgc cac acc aga caa gca agc gag 778
Pro Gln Val Lys Val Glu Lys Thr Arg His Thr Arg Gln Ala Ser Glu
225 230 235 240

gaa gac ctt cct ata aat gac tat act gaa aat gga att gaa ttt gac 826
Glu Asp Leu Pro Ile Asn Asp Tyr Thr Glu Asn Gly Ile Glu Phe Asp
245 250 255

cca atg ctg gat gag aga ggt tac tgt tgt att tac tgt cgt cga ggc 874
Pro Met Leu Asp Glu Arg Gly Tyr Cys Cys Ile Tyr Cys Arg Arg Gly
260 265 270

aac cgt tac tgc cgc cgt gtc tgt gaa cct tta cta ggc tac tac cca 922
Asn Arg Tyr Cys Arg Arg Val Cys Glu Pro Leu Leu Gly Tyr Tyr Pro
275 280 285

tac ccc tac tgc tac caa gga ggt cga gtc atc tgt cgt gtc atc atg 970

Tyr Pro Tyr Cys Tyr Gln Gly Gly Arg Val Ile Cys Arg Val Ile Met

290 295 300

cct tgc aac tgg tgg gtg gcc cgc atg ctt ggg aga gtc taa 1012

Pro Cys Asn Trp Trp Val Ala Arg Met Leu Gly Arg Val

305 310 315

taggaagatt gagttcaaac gcttaacctt ctgttagcca atatataatt aatgcatgct 1072

actccatgaa tttctgccta tgaggcattt gcctccaagt agcctatcct tcagaattac 1132

ttgtaggata ttcctctctt catgttctaa taaacttcta catcatca 1180

<210> 4

<211> 317

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

Met Ala Lys Asn Pro Pro Glu Asn Cys Glu Gly Cys His Ile Leu Asn

1 5 10 15

Ala Glu Ala Leu Lys Ser Lys Lys Ile Cys Lys Ser Leu Lys Ile Cys

20 25 30

Gly Leu Val Phe Gly Ile Leu Ala Leu Thr Leu Ile Val Leu Phe Trp

35 40 45

Gly Ser Lys His Phe Trp Pro Glu Val Ser Lys Lys Thr Tyr Asp Met

50 55 60

Glu His Thr Phe Tyr Ser Asn Gly Glu Lys Lys Lys Ile Tyr Met Glu

65 70 75 80

Ile Asp Pro Ile Thr Arg Thr Glu Ile Phe Arg Ser Gly Asn Gly Thr

85 90 95

Asp Glu Thr Leu Glu Val His Asp Phe Lys Asn Gly Tyr Thr Gly Ile

100 105 110

Tyr Phe Val Gly Leu Gln Lys Cys Phe Ile Lys Thr Gln Ile Lys Val

115 120 125

Ile Pro Glu Phe Ser Glu Pro Glu Glu Glu Ile Asp Glu Asn Glu Glu

130 135 140

Ile Thr Thr Thr Phe Phe Glu Gln Ser Val Ile Trp Val Pro Ala Glu

145 150 155 160

Lys Pro Ile Glu Asn Arg Asp Phe Leu Lys Asn Ser Lys Ile Leu Glu

165 170 175

Ile Cys Asp Asn Val Thr Met Tyr Trp Ile Asn Pro Thr Leu Ile Ala

180 185 190

Val Ser Glu Leu Gln Asp Phe Glu Glu Asp Gly Glu Asp Leu His Phe

195 200 205

Pro Thr Ser Glu Lys Lys Gly Ile Asp Gln Asn Glu Gln Trp Val Val

210 215 220

Pro Gln Val Lys Val Glu Lys Thr Arg His Thr Arg Gln Ala Ser Glu

225 230 235 240

Glu Asp Leu Pro Ile Asn Asp Tyr Thr Glu Asn Gly Ile Glu Phe Asp

245 250 255

Pro Met Leu Asp Glu Arg Gly Tyr Cys Cys Ile Tyr Cys Arg Arg Gly

260 265 270

Asn Arg Tyr Cys Arg Arg Val Cys Glu Pro Leu Leu Gly Tyr Tyr Pro

275 280 285

Tyr Pro Tyr Cys Tyr Gln Gly Gly Arg Val Ile Cys Arg Val Ile Met

290 295 300

Pro Cys Asn Trp Trp Val Ala Arg Met Leu Gly Arg Val

305 310 315

<210> 5

<211> 1197

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<220>

<221> CDS

<222> (68)..(1021)

<400> 5

actccacctc agcagtggtc tctcagtcct ctcaaagcaa ggaaagagca ctgtgtgctg 60

ggagacc atg gca aag aat cct cca gag aac tgt gag ggc tgt cac att 109
Met Ala Lys Asn Pro Pro Glu Asn Cys Glu Gly Cys His Ile
1 5 10

cta aat gca gaa gct ctg aaa tct aag aag ata cgt aaa tca ctg aag 157
Leu Asn Ala Glu Ala Leu Lys Ser Lys Lys Ile Arg Lys Ser Leu Lys
15 20 25 30

att tgt gga cta gtg ttt ggt atc ctg gcc tta act cta att gtc ctg 205
Ile Cys Gly Leu Val Phe Gly Ile Leu Ala Leu Thr Leu Ile Val Leu
35 40 45

ttt tgg ggg agc aaa cac ttc tgg ccc gag gta tcc aag aag acc tat 253
Phe Trp Gly Ser Lys His Phe Trp Pro Glu Val Ser Lys Lys Thr Tyr
50 55 60

ggc atg gag cac act ttc tac agc aat ggc gag aag aag aag att tcc 301
Gly Met Glu His Thr Phe Tyr Ser Asn Gly Glu Lys Lys Lys Ile Ser
65 70 75

atg gaa att gat ccc ata acc aga aca gaa ata ttc aga agt gga aat 349
Met Glu Ile Asp Pro Ile Thr Arg Thr Glu Ile Phe Arg Ser Gly Asn
80 85 90

ggc acc gat gaa aca ttg gaa gtc cat gac ttt aaa aac gga tac act 397
Gly Thr Asp Glu Thr Leu Glu Val His Asp Phe Lys Asn Gly Tyr Thr
95 100 105 110

ggc atc tac ttt gta ggt ctt caa aaa tgc ttt att aaa act caa atc 445
Gly Ile Tyr Phe Val Gly Leu Gln Lys Cys Phe Ile Lys Thr Gln Ile
115 120 125

aaa gtg att cct gaa ttt tct gaa cca gaa gag gaa ata gat gag aat 493
Lys Val Ile Pro Glu Phe Ser Glu Pro Glu Glu Glu Ile Asp Glu Asn
130 135 140

gaa gaa att act aca acg ttc ttt gaa cag tca gtg att tgg gtt cct 541
Glu Glu Ile Thr Thr Thr Phe Phe Glu Gln Ser Val Ile Trp Val Pro
145 150 155

gca gaa aag cct att gaa aac aga gac ttc ctg aaa aat tct aaa att 589
Ala Glu Lys Pro Ile Glu Asn Arg Asp Phe Leu Lys Asn Ser Lys Ile
160 165 170

ctg gag att tgc gac aat gtg act atg tac tgg atc aat ccc act cta 637
Leu Glu Ile Cys Asp Asn Val Thr Met Tyr Trp Ile Asn Pro Thr Leu
175 180 185 190

ata gca gtt tca gaa tta cag gac ttt gag gag gat ggt gaa gat ctt 685
Ile Ala Val Ser Glu Leu Gln Asp Phe Glu Glu Asp Gly Glu Asp Leu
195 200 205

cac ttt cct acc agc gaa aaa aaa ggg att gac cag aat gag caa tgg 733
His Phe Pro Thr Ser Glu Lys Lys Gly Ile Asp Gln Asn Glu Gln Trp
210 215 220

gtg gtc cca caa gtg aag gtg gag aag acc cgc cgc acc aga caa gca 781
Val Val Pro Gln Val Lys Val Glu Lys Thr Arg Arg Thr Arg Gln Ala
225 230 235

agc gag gaa gac ctt cct gtt aat gac tat act gaa aat gga atc gaa 829
Ser Glu Glu Asp Leu Pro Val Asn Asp Tyr Thr Glu Asn Gly Ile Glu
240 245 250

ttt gat ccc atg ctg gat gag aga ggt tac tgt tgt att tac tgc cgt 877
Phe Asp Pro Met Leu Asp Glu Arg Gly Tyr Cys Cys Ile Tyr Cys Arg
255 260 265 270

cga ggc aac cgc tac tgc cgc agg gtc tgt gaa cct tta cta ggc tac 925
Arg Gly Asn Arg Tyr Cys Arg Arg Val Cys Glu Pro Leu Leu Gly Tyr
275 280 285

tac cca tac ccc tac tgc tac caa gga ggt cga gtc atc tgt cgt gtc 973
Tyr Pro Tyr Pro Tyr Cys Tyr Gln Gly Gly Arg Val Ile Cys Arg Val
290 295 300

atc atg cct tgc aac tgg tgg gtg gcc cgc atg ctt ggg aga gtc taa 1021
Ile Met Pro Cys Asn Trp Trp Val Ala Arg Met Leu Gly Arg Val
305 310 315

taggaagttt gagtccaaat gcttaacctt ttgttagcca acatataatt aatgcatgct 1081

actccatgaa tttctgcatt tgcctccaag tagcctatcc tccagaatta tttgtaggat 1141

attcctctct tcgtgttcta ataaacgtct acatcatcat caaaaaaaaa aaaaaa 1197

<210> 6

<211> 317

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 6

Met Ala Lys Asn Pro Pro Glu Asn Cys Glu Gly Cys His Ile Leu Asn
1 5 10 15

Ala Glu Ala Leu Lys Ser Lys Lys Ile Arg Lys Ser Leu Lys Ile Cys
20 25 30

Gly Leu Val Phe Gly Ile Leu Ala Leu Thr Leu Ile Val Leu Phe Trp
35 40 45
Gly Ser Lys His Phe Trp Pro Glu Val Ser Lys Lys Thr Tyr Gly Met
50 55 60
Glu His Thr Phe Tyr Ser Asn Gly Glu Lys Lys Lys Ile Ser Met Glu
65 70 75 80
Ile Asp Pro Ile Thr Arg Thr Glu Ile Phe Arg Ser Gly Asn Gly Thr
85 90 95
Asp Glu Thr Leu Glu Val His Asp Phe Lys Asn Gly Tyr Thr Gly Ile
100 105 110
Tyr Phe Val Gly Leu Gln Lys Cys Phe Ile Lys Thr Gln Ile Lys Val
115 120 125
Ile Pro Glu Phe Ser Glu Pro Glu Glu Glu Ile Asp Glu Asn Glu Glu
130 135 140
Ile Thr Thr Thr Phe Phe Glu Gln Ser Val Ile Trp Val Pro Ala Glu
145 150 155 160
Lys Pro Ile Glu Asn Arg Asp Phe Leu Lys Asn Ser Lys Ile Leu Glu
165 170 175
Ile Cys Asp Asn Val Thr Met Tyr Trp Ile Asn Pro Thr Leu Ile Ala
180 185 190
Val Ser Glu Leu Gln Asp Phe Glu Glu Asp Gly Glu Asp Leu His Phe
195 200 205
Pro Thr Ser Glu Lys Lys Gly Ile Asp Gln Asn Glu Gln Trp Val Val
210 215 220
Pro Gln Val Lys Val Glu Lys Thr Arg Arg Thr Arg Gln Ala Ser Glu
225 230 235 240
Glu Asp Leu Pro Val Asn Asp Tyr Thr Glu Asn Gly Ile Glu Phe Asp

245 250 255

Pro Met Leu Asp Glu Arg Gly Tyr Cys Cys Ile Tyr Cys Arg Arg Gly

260 265 270

Asn Arg Tyr Cys Arg Arg Val Cys Glu Pro Leu Leu Gly Tyr Tyr Pro

275 280 285

Tyr Pro Tyr Cys Tyr Gln Gly Gly Arg Val Ile Cys Arg Val Ile Met

290 295 300

Pro Cys Asn Trp Trp Val Ala Arg Met Leu Gly Arg Val

305 310 315

<210> 7

<211> 27

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

gagaccatgg caaagaatcc tccagag 27

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

ttagaccctc cccagcatgc gggc 24

<210> 9

<211> 27

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 9

gagaccatgg caaagaatcc tccagag 27

<210> 10

<211> 24

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 10

ttagactctc ccaagcatgc gggc 24

<210> 11

<211> 27

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<400> 11

gagaccatgg caaagaatcc tccagag 27

<210> 12

<211> 24

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<400> 12

ttagactctc ccaagcatgc gggc 24

<210> 13

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 13

gaccctcccc agcatgcggg c 21

<210> 14

<211> 21

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 14

gactctccca agcatgcggg c 21

<210> 15

<211> 975

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(975)

<400> 15

atg gca aag aat cct cca gag aat tgt gaa gac tgt cac att cta aat 48
Met Ala Lys Asn Pro Pro Glu Asn Cys Glu Asp Cys His Ile Leu Asn
1 5 10 15

gca gaa gct ttt aaa tcc aag aaa ata tgt aaa tca ctt aag att tgt 96
Ala Glu Ala Phe Lys Ser Lys Lys Ile Cys Lys Ser Leu Lys Ile Cys
20 25 30

gga ctg gtg ttt ggt atc ctg gcc cta act cta att gtc ctg ttt tgg 144
Gly Leu Val Phe Gly Ile Leu Ala Leu Thr Leu Ile Val Leu Phe Trp
35 40 45

ggg agc aag cac ttc tgg ccg gag gta ccc aaa aaa gcc tat gac atg 192
Gly Ser Lys His Phe Trp Pro Glu Val Pro Lys Lys Ala Tyr Asp Met
50 55 60

gag cac act ttc tac agc aat gga gag aag aag aag att tac atg gaa 240
Glu His Thr Phe Tyr Ser Asn Gly Glu Lys Lys Lys Ile Tyr Met Glu
65 70 75 80

att gat cct gtg acc aga act gaa ata ttc aga agc gga aat ggc act 288

Ile Asp Pro Val Thr Arg Thr Glu Ile Phe Arg Ser Gly Asn Gly Thr
85 90 95

gat gaa aca ttg gaa gta cac gac ttt aaa aac gga tac act ggc atc 336
Asp Glu Thr Leu Glu Val His Asp Phe Lys Asn Gly Tyr Thr Gly Ile
100 105 110

tac ttc gtg ggt ctt caa aaa tgt ttt atc aaa act cag att aaa gtg 384
Tyr Phe Val Gly Leu Gln Lys Cys Phe Ile Lys Thr Gln Ile Lys Val
115 120 125

att cct gaa ttt tct gaa cca gaa gag gaa ata gat gag aat gaa gaa 432
Ile Pro Glu Phe Ser Glu Pro Glu Glu Glu Ile Asp Glu Asn Glu Glu
130 135 140

att acc aca act ttc ttt gaa cag tca gtg att tgg gtc cca gca gaa 480
Ile Thr Thr Thr Phe Phe Glu Gln Ser Val Ile Trp Val Pro Ala Glu
145 150 155 160

aag cct att gaa aac cga gat ttt ctt aaa aat tcc aaa att ctg gag 528
Lys Pro Ile Glu Asn Arg Asp Phe Leu Lys Asn Ser Lys Ile Leu Glu
165 170 175

att tgt gat aac gtg acc atg tat tgg atc aat ccc act cta ata tca 576
Ile Cys Asp Asn Val Thr Met Tyr Trp Ile Asn Pro Thr Leu Ile Ser
180 185 190

gtt tct gag tta caa gac ttt gag gag gag gga gaa gat ctt cac ttt 624
Val Ser Glu Leu Gln Asp Phe Glu Glu Glu Gly Glu Asp Leu His Phe
195 200 205

cct gcc aac gaa aaa aaa ggg att gaa caa aat gaa cag tgg gtg gtc 672
Pro Ala Asn Glu Lys Lys Gly Ile Glu Gln Asn Glu Gln Trp Val Val
210 215 220

cct caa gtg aaa gta gag aag acc cgt cac gcc aga caa gca agt gag 720

Pro Gln Val Lys Val Glu Lys Thr Arg His Ala Arg Gln Ala Ser Glu

225 230 235 240

gaa gaa ctt cca ata aat gac tat act gaa aat gga ata gaa ttt gat 768

Glu Glu Leu Pro Ile Asn Asp Tyr Thr Glu Asn Gly Ile Glu Phe Asp

245 250 255

ccc atg ctg gat gag aga ggt tat tgt tgt att tac tgc cgt cga ggc 816

Pro Met Leu Asp Glu Arg Gly Tyr Cys Cys Ile Tyr Cys Arg Arg Gly

260 265 270

aac cgc tat tgc cgc cgc gtc tgt gaa cct tta cta ggc tac tac cca 864

Asn Arg Tyr Cys Arg Arg Val Cys Glu Pro Leu Leu Gly Tyr Tyr Pro

275 280 285

tat cca tac tgc tac caa gga gga cga gtc atc tgt cgt gtc atc atg 912

Tyr Pro Tyr Cys Tyr Gln Gly Gly Arg Val Ile Cys Arg Val Ile Met

290 295 300

cct tgt aac tgg tgg gtg gcc cgc atg ctg ggg agg gtc gct cat cat 960

Pro Cys Asn Trp Trp Val Ala Arg Met Leu Gly Arg Val Ala His His

305 310 315 320

cat cat cat cat taa 975

His His His His

<210> 16

<211> 324

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Met Ala Lys Asn Pro Pro Glu Asn Cys Glu Asp Cys His Ile Leu Asn

1 5 10 15

Ala Glu Ala Phe Lys Ser Lys Lys Ile Cys Lys Ser Leu Lys Ile Cys

20 25 30

Gly Leu Val Phe Gly Ile Leu Ala Leu Thr Leu Ile Val Leu Phe Trp

35 40 45

Gly Ser Lys His Phe Trp Pro Glu Val Pro Lys Lys Ala Tyr Asp Met

50 55 60

Glu His Thr Phe Tyr Ser Asn Gly Glu Lys Lys Lys Ile Tyr Met Glu

65 70 75 80

Ile Asp Pro Val Thr Arg Thr Glu Ile Phe Arg Ser Gly Asn Gly Thr

85 90 95

Asp Glu Thr Leu Glu Val His Asp Phe Lys Asn Gly Tyr Thr Gly Ile

100 105 110

Tyr Phe Val Gly Leu Gln Lys Cys Phe Ile Lys Thr Gln Ile Lys Val

115 120 125

Ile Pro Glu Phe Ser Glu Pro Glu Glu Glu Ile Asp Glu Asn Glu Glu

130 135 140

Ile Thr Thr Thr Phe Phe Glu Gln Ser Val Ile Trp Val Pro Ala Glu

145 150 155 160

Lys Pro Ile Glu Asn Arg Asp Phe Leu Lys Asn Ser Lys Ile Leu Glu

165 170 175

Ile Cys Asp Asn Val Thr Met Tyr Trp Ile Asn Pro Thr Leu Ile Ser

180 185 190

Val Ser Glu Leu Gln Asp Phe Glu Glu Glu Gly Glu Asp Leu His Phe

195 200 205

Pro Ala Asn Glu Lys Lys Gly Ile Glu Gln Asn Glu Gln Trp Val Val

210 215 220

Pro Gln Val Lys Val Glu Lys Thr Arg His Ala Arg Gln Ala Ser Glu

225 230 235 240

Glu Glu Leu Pro Ile Asn Asp Tyr Thr Glu Asn Gly Ile Glu Phe Asp
245 250 255

Pro Met Leu Asp Glu Arg Gly Tyr Cys Cys Ile Tyr Cys Arg Arg Gly
260 265 270

Asn Arg Tyr Cys Arg Arg Val Cys Glu Pro Leu Leu Gly Tyr Tyr Pro
275 280 285

Tyr Pro Tyr Cys Tyr Gln Gly Gly Arg Val Ile Cys Arg Val Ile Met
290 295 300

Pro Cys Asn Trp Trp Val Ala Arg Met Leu Gly Arg Val Ala His His
305 310 315 320

His His His His

<210> 17

<211> 975

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(975)

<400> 17

atg gca aag aat cct cca gag aac tgt gag ggc tgt cac att cta aat 48
Met Ala Lys Asn Pro Pro Glu Asn Cys Glu Gly Cys His Ile Leu Asn
1 5 10 15

gca gaa gct ctg aaa tct aag aag ata tgt aaa tca ctg aag att tgt 96
Ala Glu Ala Leu Lys Ser Lys Lys Ile Cys Lys Ser Leu Lys Ile Cys
20 25 30

gga cta gtg ttt ggt atc ctg gcc tta act cta att gtc ctg ttt tgg 144
Gly Leu Val Phe Gly Ile Leu Ala Leu Thr Leu Ile Val Leu Phe Trp

35 40 45

ggg agc aaa cac ttc tgg ccc gag gta tcc aag aaa acc tat gac atg 192
Gly Ser Lys His Phe Trp Pro Glu Val Ser Lys Lys Thr Tyr Asp Met
50 55 60

gag cac act ttc tac agc aac ggc gag aag aag aag att tac atg gaa 240
Glu His Thr Phe Tyr Ser Asn Gly Glu Lys Lys Lys Ile Tyr Met Glu
65 70 75 80

att gat ccc ata acc aga aca gaa ata ttc aga agt gga aat ggc act 288
Ile Asp Pro Ile Thr Arg Thr Glu Ile Phe Arg Ser Gly Asn Gly Thr
85 90 95

gat gaa aca ttg gaa gtc cat gac ttt aaa aat gga tac act ggc atc 336
Asp Glu Thr Leu Glu Val His Asp Phe Lys Asn Gly Tyr Thr Gly Ile
100 105 110

tac ttt gta ggt ctt caa aaa tgc ttt att aaa act caa atc aaa gtg 384
Tyr Phe Val Gly Leu Gln Lys Cys Phe Ile Lys Thr Gln Ile Lys Val
115 120 125

att cct gaa ttt tct gaa cca gag gaa gaa ata gat gag aat gaa gaa 432
Ile Pro Glu Phe Ser Glu Pro Glu Glu Glu Ile Asp Glu Asn Glu Glu
130 135 140

att act aca act ttc ttt gaa cag tca gtg att tgg gtt ccc gca gaa 480
Ile Thr Thr Thr Phe Phe Glu Gln Ser Val Ile Trp Val Pro Ala Glu
145 150 155 160

aag cct att gaa aac aga gac ttc ctg aaa aat tct aaa att ctg gag 528
Lys Pro Ile Glu Asn Arg Asp Phe Leu Lys Asn Ser Lys Ile Leu Glu
165 170 175

att tgc gat aat gtg acc atg tac tgg atc aat ccc act cta ata gca 576
Ile Cys Asp Asn Val Thr Met Tyr Trp Ile Asn Pro Thr Leu Ile Ala

180 185 190

gtt tca gaa tta cag gac ttt gag gag gac ggt gaa gat ctt cac ttt 624
Val Ser Glu Leu Gln Asp Phe Glu Glu Asp Gly Glu Asp Leu His Phe
195 200 205

cct acc agt gaa aaa aag ggg att gac cag aat gag caa tgg gtg gtc 672
Pro Thr Ser Glu Lys Lys Gly Ile Asp Gln Asn Glu Gln Trp Val Val
210 215 220

ccg caa gtg aag gtg gag aag acc cgc cac acc aga caa gca agc gag 720
Pro Gln Val Lys Val Glu Lys Thr Arg His Thr Arg Gln Ala Ser Glu
225 230 235 240

gaa gac ctt cct ata aat gac tat act gaa aat gga att gaa ttt gac 768
Glu Asp Leu Pro Ile Asn Asp Tyr Thr Glu Asn Gly Ile Glu Phe Asp
245 250 255

cca atg ctg gat gag aga ggt tac tgt tgt att tac tgt cgt cga ggc 816
Pro Met Leu Asp Glu Arg Gly Tyr Cys Cys Ile Tyr Cys Arg Arg Gly
260 265 270

aac cgt tac tgc cgc cgt gtc tgt gaa cct tta cta ggc tac tac cca 864
Asn Arg Tyr Cys Arg Arg Val Cys Glu Pro Leu Leu Gly Tyr Tyr Pro
275 280 285

tac ccc tac tgc tac caa gga ggt cga gtc atc tgt cgt gtc atc atg 912
Tyr Pro Tyr Cys Tyr Gln Gly Gly Arg Val Ile Cys Arg Val Ile Met
290 295 300

cct tgc aac tgg tgg gtg gcc cgc atg ctt ggg aga gtc gct cat cat 960
Pro Cys Asn Trp Trp Val Ala Arg Met Leu Gly Arg Val Ala His His
305 310 315 320

cat cat cat cat taa 975
His His His His

<210> 18

<211> 324

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 18

Met Ala Lys Asn Pro Pro Glu Asn Cys Glu Gly Cys His Ile Leu Asn
1 5 10 15

Ala Glu Ala Leu Lys Ser Lys Lys Ile Cys Lys Ser Leu Lys Ile Cys
20 25 30

Gly Leu Val Phe Gly Ile Leu Ala Leu Thr Leu Ile Val Leu Phe Trp
35 40 45

Gly Ser Lys His Phe Trp Pro Glu Val Ser Lys Lys Thr Tyr Asp Met
50 55 60

Glu His Thr Phe Tyr Ser Asn Gly Glu Lys Lys Lys Ile Tyr Met Glu
65 70 75 80

Ile Asp Pro Ile Thr Arg Thr Glu Ile Phe Arg Ser Gly Asn Gly Thr
85 90 95

Asp Glu Thr Leu Glu Val His Asp Phe Lys Asn Gly Tyr Thr Gly Ile
100 105 110

Tyr Phe Val Gly Leu Gln Lys Cys Phe Ile Lys Thr Gln Ile Lys Val
115 120 125

Ile Pro Glu Phe Ser Glu Pro Glu Glu Glu Ile Asp Glu Asn Glu Glu
130 135 140

Ile Thr Thr Thr Phe Phe Glu Gln Ser Val Ile Trp Val Pro Ala Glu
145 150 155 160

Lys Pro Ile Glu Asn Arg Asp Phe Leu Lys Asn Ser Lys Ile Leu Glu
165 170 175

Ile Cys Asp Asn Val Thr Met Tyr Trp Ile Asn Pro Thr Leu Ile Ala
180 185 190

Val Ser Glu Leu Gln Asp Phe Glu Glu Asp Gly Glu Asp Leu His Phe
195 200 205

Pro Thr Ser Glu Lys Lys Gly Ile Asp Gln Asn Glu Gln Trp Val Val
210 215 220

Pro Gln Val Lys Val Glu Lys Thr Arg His Thr Arg Gln Ala Ser Glu
225 230 235 240

Glu Asp Leu Pro Ile Asn Asp Tyr Thr Glu Asn Gly Ile Glu Phe Asp
245 250 255

Pro Met Leu Asp Glu Arg Gly Tyr Cys Cys Ile Tyr Cys Arg Arg Gly
260 265 270

Asn Arg Tyr Cys Arg Arg Val Cys Glu Pro Leu Leu Gly Tyr Tyr Pro
275 280 285

Tyr Pro Tyr Cys Tyr Gln Gly Gly Arg Val Ile Cys Arg Val Ile Met
290 295 300

Pro Cys Asn Trp Trp Val Ala Arg Met Leu Gly Arg Val Ala His His
305 310 315 320

His His His His

<210> 19

<211> 69

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: signal sequence of preprotrypsin and FLAG peptide

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(69)

<400> 19

atg tct gca ctt ctg atc cta gct ctt gtt gga gct gca gtt gct gac 48

Met Ser Ala Leu Leu Ile Leu Ala Leu Val Gly Ala Ala Val Ala Asp

1 5 10 15

tac aaa gac gat gac gac aag 69

Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

20

<210> 20

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence: signal sequence of preprotrypsin and FLAG peptide

<400> 20

Met Ser Ala Leu Leu Ile Leu Ala Leu Val Gly Ala Ala Val Ala Asp

1 5 10 15

Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

20

<210> 21

<211> 23

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 21

gagggagaag atcttcactt tcc 23

<210> 22

<211> 432

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:signal sequence of preprotrypsin, FLAG peptide and C terminal region of ChM1L

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(432)

<400> 22

atg tct gca ctt ctg atc cta gct ctt gtt gga gct gca gtt gct gac 48
Met Ser Ala Leu Leu Ile Leu Ala Leu Val Gly Ala Ala Val Ala Asp
1 5 10 15

tac aaa gac gat gac gac aag ctg gaa ttc gat gag gga gaa gat ctt 96
Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Leu Glu Phe Asp Glu Gly Glu Asp Leu
20 25 30

cac ttt cct gcc aac gaa aaa aaa ggg att gaa caa aat gaa cag tgg 144
His Phe Pro Ala Asn Glu Lys Lys Gly Ile Glu Gln Asn Glu Gln Trp
35 40 45

gtg gtc cct caa gtg aaa gta gag aag acc cgt cac gcc aga caa gca 192
Val Val Pro Gln Val Lys Val Glu Lys Thr Arg His Ala Arg Gln Ala
50 55 60

agt gag gaa gaa ctt cca ata aat gac tat act gaa aat gga ata gaa 240
Ser Glu Glu Glu Leu Pro Ile Asn Asp Tyr Thr Glu Asn Gly Ile Glu
65 70 75 80

ttt gat ccc atg ctg gat gag aga ggt tat tgt tgt att tac tgc cgt 288

Phe Asp Pro Met Leu Asp Glu Arg Gly Tyr Cys Cys Ile Tyr Cys Arg

85 90 95

cga ggc aac cgc tat tgc cgc cgc gtc tgt gaa cct tta cta ggc tac 336

Arg Gly Asn Arg Tyr Cys Arg Arg Val Cys Glu Pro Leu Leu Gly Tyr

100 105 110

tac cca tat cca tac tgc tac caa gga gga cga gtc atc tgt cgt gtc 384

Tyr Pro Tyr Pro Tyr Cys Tyr Gln Gly Gly Arg Val Ile Cys Arg Val

115 120 125

atc atg cct tgt aac tgg tgg gtg gcc cgc atg ctg ggg agg gtc taa 432

Ile Met Pro Cys Asn Trp Trp Val Ala Arg Met Leu Gly Arg Val

130 135 140

<210> 23

<211> 143

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence:signal sequence of preprotrypsin, FLAG peptide and C terminal region of ChM1L

<400> 23

Met Ser Ala Leu Leu Ile Leu Ala Leu Val Gly Ala Ala Val Ala Asp

1 5 10 15

Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Leu Glu Phe Asp Glu Gly Glu Asp Leu

20 25 30

His Phe Pro Ala Asn Glu Lys Lys Gly Ile Glu Gln Asn Glu Gln Trp

35 40 45

Val Val Pro Gln Val Lys Val Glu Lys Thr Arg His Ala Arg Gln Ala

50 55 60

Ser Glu Glu Glu Leu Pro Ile Asn Asp Tyr Thr Glu Asn Gly Ile Glu
65 70 75 80

Phe Asp Pro Met Leu Asp Glu Arg Gly Tyr Cys Cys Ile Tyr Cys Arg
85 90 95

Arg Gly Asn Arg Tyr Cys Arg Arg Val Cys Glu Pro Leu Leu Gly Tyr
100 105 110

Tyr Pro Tyr Pro Tyr Cys Tyr Gln Gly Gly Arg Val Ile Cys Arg Val
115 120 125

Ile Met Pro Cys Asn Trp Trp Val Ala Arg Met Leu Gly Arg Val
130 135 140

<210> 24

<211> 21

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 24

tcagccatga cagagaactc a 21

<210> 25

<211> 21

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 25

ttacaccatg cccaagatgc g 21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP00/06804

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl[7] C12N15/12, C12Q1/68, C12P21/08, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl[7] C12N15/12, C12Q1/68, C12P21/08, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX/PY	WO, 2000/29579, A1 (ZYMOGENETICS INC), 25 May, 2000 (25.05.00) & AU, 20001622, A	1,4,7,10-27/ 2,3,5,6,8,9
PX/PY	WO, 2000/12708, A2 (GENENTECH INC), 09 March, 2000 (09.03.00), Fig. 2 & AU, 9955908, A	1,4,7,10-27/ 2,3,5,6,8,9
Y	US, 5719125, A (MITUBISI CHEM CORP), 17 November, 1994 (17.11.94) & CA, 2122937, A & JP, 7-138295, A & EP, 624645, A1	1-27
Y	EP, 869180, A1 (SMITHKLINE BEECHAM CORP), 07 October, 1998 (07.10.98), page 15, lines 21 to 32 & JP, 10-323194, A & CA, 2232743, A	1-27

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
20 November, 2000 (20.11.00)	28 November, 2000 (28.11.00)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

国際調査報告

国際出願番号　PCT／JP00／06804

A.　発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））
Int.Cl' C12N15／12, C12Q1／68, C12P21／08, C12N1／15, C12N1／19, C12N1／21, C12N5／10

B.　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））
Int.Cl' C12N15／12, C12Q1／68, C12P21／08, C12N1／15, C12N1／19, C12N1／21, C12N5／10

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）
Genbank／EMBL／DDBJ／GeneSeq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C.　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
PX/PY	WO, 2000/29579, A1 (ZYMOGENETICS INC) 25.05月.2000 (25.05.00) &AU, 20001622, A	1, 4, 7, 10-27/ 2, 3, 5, 6, 8, 9
PX/PY	WO, 2000/12708, A2 (GENENTECH INC) 09.03月.2000 (09.03.00) Figure2& AU, 9955908, A	1, 4, 7, 10-27/ 2, 3, 5, 6, 8, 9
Y	US, 5719125, A (MITUBISI CHEM CORP) 17.11月.1994 (17.11.94) & CA, 2122937, A & JP, 7-138295, A &EP, 624645, A1	1－27

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。　☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日　20.11.00

国際調査報告の発送日　28.11.00

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ISA／JP）
郵便番号100－8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）　4N　9217
山村　祥子

電話番号　03－3581－1101　内線　3488

国際調査報告

国際出願番号　PCT／JP00／06804

C（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
Y	EP, 869180, A1 (SMITHKLINE BEECHAM CORP) 07. 10月. 1998 (07. 10. 98)第15頁第21-32行 & JP, 10-323194, A & CA, 2232743, A	1－27